

---

# ***ORM-like protein (ORMDL) - Annäherung an die Funktion über die Interaktion***

**Julian Klingbeil**

---



München 2019



Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen  
Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

*ORM-like protein* (ORMDL) – Annäherung an die Funktion über die  
Interaktion

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
zu München

vorgelegt von  
Julian Malte Klingbeil

aus  
Berlin  
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatteerin: Prof. Dr. Ania Muntau

Mitberichterstatte: Prof. Dr. Katja Radon  
PD Dr. Anne Hilgendorff  
Prof. Dr. Jürgen Behr  
Prof. Dr. Ortrud Steinlein

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Søren Gersting

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2019



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Asthma bronchiale . . . . .	1
1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Klassifikation . . . . .	2
1.1.2 Therapie . . . . .	4
1.1.3 Gen-Umwelt-Interaktionen und Genomweite Assoziationsstudien . . . . .	5
1.2 Das neue Asthma-Risikogen ORMDL . . . . .	8
1.3 Der $\beta_2$ -Adrenorezeptor . . . . .	11
1.4 Protein-Protein-Interaktionen . . . . .	13
1.4.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer . . . . .	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	18
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Material . . . . .	19
2.1.1 Laborgeräte . . . . .	19
2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien . . . . .	21
2.1.3 Lösungen, Reagenzien-Kits und Puffer . . . . .	26
2.1.4 Medium . . . . .	28
2.1.5 Zelllinien und Bakterienstämme . . . . .	28
2.1.6 Antikörper . . . . .	29
2.1.7 $\beta$ -Sympathomimetika . . . . .	29
2.1.8 Restriktionsenzyme . . . . .	30
2.1.9 Vektoren und DNA . . . . .	30
2.1.10 Software . . . . .	39
2.2 Methoden . . . . .	40
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	40
2.2.2 Site-directed Mutagenesis (SDM) . . . . .	40
2.2.3 Recombinantes Klonieren mittels <i>Gateway</i> <sup>®</sup> Cloning System . . . . .	41
2.2.4 Hitzeschock-Transformation von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	44
2.2.5 Herstellung von Glycerinkulturen . . . . .	45
2.2.6 DNA-Aufreinigung . . . . .	45
2.2.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Gelelektrophorese . . . . .	46

2.2.8	Zellkultur . . . . .	47
2.2.9	Transfektion . . . . .	48
2.2.10	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) . . . . .	49
2.2.11	Koimmunpräzipitation (Co-IP) . . . . .	55
2.2.12	In-Cell/On-Cell ELISA . . . . .	56
2.2.13	Statistische Analyse . . . . .	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
3.1	Die Erweiterung des ORMDL-Interaktoms . . . . .	58
3.1.1	Literaturrecherche zum ORM-Interaktom . . . . .	58
3.1.2	Nachweis der Homo- und Heterooligomerisierung von ORMDL mittels Koimmunpräzipitation . . . . .	60
3.1.3	Bestätigung der Homo- und Heterooligomerisierung von ORMDL mittels BRET . . . . .	60
3.1.4	Übertragung auf humane Homologe der ORM-Interaktionspartner	63
3.1.5	Keine Erweiterung des Interaktoms über Gen-Gen-Interaktionen .	64
3.1.6	Interaktion mit relevanten immunologischen Proteinen . . . . .	65
3.1.7	Interaktion mit Membranproteinen . . . . .	68
3.1.8	Interaktion mit molekularen Chaperonen . . . . .	69
3.1.9	Interaktion mit Proteinen des $\gamma$ -Sekretase-Komplexes . . . . .	73
3.1.10	Bestätigung bekannter Interaktionen mit SPTLC1 und SERCA . . .	74
3.1.11	Interaktionen mit peroxisomalen Proteinen . . . . .	75
3.1.12	Validierung des ORMDL-Interaktoms mittels eines zufälligen Re- ferenzdatensatzes . . . . .	77
3.1.13	Zusammenfassung zur Erweiterung des ORMDL-Interaktoms . . .	79
3.1.14	Ergänzung eines hypothesenfreien Ansatzes mittels Koimmun- präzipitation zur Erweiterung des ORMDL-Interaktoms . . . . .	80
3.2	ORMDL und der $\beta_2$ -AR . . . . .	81
3.2.1	Charakterisierung der Interaktion von ORMDL mit $\beta_2$ -AR mittels BRET-Sättigungsexperimenten . . . . .	82
3.2.2	Bestätigung der Interaktion von ORMDL mit $\beta_2$ -AR mittels Koim- munpräzipitation . . . . .	83
3.2.3	Untersuchung der $\beta_2$ -AR Oligomerisierung in Abhängigkeit der häufigsten Polymorphismen mittels BRET . . . . .	84
3.2.4	Interaktion zwischen ORMDL3 und den $\beta_2$ -AR-Varianten mit un- terschiedlicher Affinität . . . . .	86
3.2.5	Modulation der Interaktionen von ORMDL mit $\beta_2$ -AR durch $\beta$ - Sympathomimetika in Abhängigkeit vom $\beta_2$ -AR-Allel . . . . .	88
3.2.6	Modulation der $\beta_2$ -AR Homooligomerisierung durch $\beta$ -Sympa- thomimetika in Abhängigkeit vom $\beta_2$ -AR-Allel . . . . .	88
3.2.7	$\beta_2$ -AR-Oberflächenexpression unter ORMDL-Einfluss im In-Cell/ On-Cell-ELISA . . . . .	91

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>94</b>
4.1	Relevanz der ORMDL Homo- und Heterooligomerisierung . . . . .	94
4.2	Das erweiterte ORMDL-Interaktom . . . . .	97
4.2.1	Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und der Sphingolipidbiosynthese . . . . .	97
4.2.2	Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und Chaperonen, der Unfolded-Protein-Response und dem Calciumstoffwechsel	98
4.2.3	Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und dem Immunsystem . . . . .	101
4.2.4	Identifikation von ORMDL als Interaktionspartner anderer Membranproteine . . . . .	104
4.2.5	Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und dem $\gamma$ -Sekretase-Komplex . . . . .	105
4.2.6	Qualitätskontrolle des erweiterten ORMDL-Interaktoms . . . . .	106
4.2.7	Methodische Aspekte zum erweiterten ORMDL-Interaktom . . . . .	106
4.2.8	Identifikation des <i>hub</i> -Proteins ORMDL . . . . .	107
4.3	ORMDL und $\beta_2$ -AR . . . . .	111
4.3.1	Oligomerisierung von $\beta_2$ -AR und ORMDL . . . . .	112
4.3.2	Homooligomerisierung von $\beta_2$ -AR . . . . .	113
4.3.3	Oligomerisierung von ORMDL3 mit $\beta_2$ -AR wird durch $\beta_2$ -AR-Allele und $\beta$ -Sympathomimetika beeinflusst . . . . .	118
4.3.4	ORMDL3 als akzessorisches Protein für die Oberflächenexpression von $\beta_2$ -AR . . . . .	120
4.4	Ausblick zu ORMDL und Asthma . . . . .	123
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>134</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Prädiktion der Tertiärstruktur von ORMDL3 . . . . .	8
1.2	BRET-Funktionsprinzip . . . . .	16
2.1	Vektorkarten der BRET-Expressionsvektoren . . . . .	32
2.2	BP-Reaktion . . . . .	42
2.3	LR-Reaktion . . . . .	44
2.4	BRET-Markerkombinationen . . . . .	50
2.5	BRET-Spektren: Venus und hRluc . . . . .	52
2.6	BRET-Sättigungskurve . . . . .	54
3.1	ORMDL Homo-/Heterooligomerisierung (Co-IP) . . . . .	61
3.2	ORMDL Homo- und Heterooligomerisierung (BRET) . . . . .	62
3.3	ORMDL Interaktom: PPI mit SPTLC1 und ATP2A2 (BRET) . . . . .	74
3.4	ORMDL Interaktom: subzelluläre Lokalisation . . . . .	79
3.5	ORMDL Interaktom: wahrscheinliche Interaktionspartner (Co-IP mit Tandem-Massenspektrometrie) . . . . .	80
3.6	ORMDL Interaktom: mögliche Interaktionspartner (Co-IP mit Tandem-Massenspektrometrie) . . . . .	81
3.7	ORMDL und $\beta_2$ -AR: Sättigungskurve (BRET) . . . . .	82
3.8	ORMDL und $\beta_2$ -AR: Interaktion (Co-IP) . . . . .	83
3.9	$\beta_2$ -AR-Allele: Homo-/Heterooligomerisierung (BRET) . . . . .	85
3.10	ORMDL und $\beta_2$ -AR-Allele: Sättigungskurven (BRET) . . . . .	87
3.11	ORMDL und $\beta_2$ -AR-Allele: BRET <sub>50</sub> und BRET <sub>max</sub> (BRET) . . . . .	87
3.12	ORMDL3 und $\beta_2$ -AR: Sättigungskurven und BRET <sub>50</sub> unter Sympathomimetikaeinfluss (BRET) . . . . .	89
3.13	$\beta_2$ -AR Homooligomerisierung unter Sympathomimetikaeinfluss (BRET) . . . . .	90
3.14	ORMDL und $\beta_2$ -AR: Oberflächenexpression von $\beta_2$ -AR (ELISA) . . . . .	92
3.15	ORMDL und $\beta_2$ -AR-Allele: Oberflächenexpression der $\beta_2$ -AR-Allele (ELISA) . . . . .	92
4.1	ORMDL Interaktom . . . . .	108



# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Geräte . . . . .	19
2.2	Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien . . . . .	21
2.3	Lösungen und Puffer . . . . .	26
2.4	Zellkulturmedien . . . . .	28
2.5	Zelllinien und Bakterienstämme . . . . .	28
2.6	Antikörper . . . . .	29
2.7	$\beta$ -Sympathomimetika . . . . .	29
2.8	Restriktionsenzyme . . . . .	30
2.9	Plasmid-Vektoren . . . . .	30
2.10	Venus- und hRluc-Sequenz . . . . .	33
2.11	Übersicht aller verwendeten BRET-Vektoren . . . . .	34
2.12	Primersequenzen für die Sequenzanalyse von cDNA im pDEST-Vektor . .	38
2.13	Primersequenzen für die Sequenzanalyse von cDNA im pENTR-Vektor .	38
2.14	Primersequenzen für die SDM der $\beta$ 2AR . . . . .	38
2.15	Verwendete Softwareprogramme und Datenbanken . . . . .	39
3.1	ORMDL Interaktom: humane Homologe der ORM-Interaktionspartner . .	59
3.2	ORMDL Homo-/Heterodimerisierung: BRET <sub>50</sub> (BRET) . . . . .	63
3.3	ORMDL-Interaktom: Hefehomologe (BRET) . . . . .	64
3.4	ORMDL Interaktom: Gen-Gen-Interaktionen (BRET) . . . . .	65
3.5	ORMDL Interaktom: immunologisch relevante Proteine (BRET) . . . . .	66
3.6	ORMDL Interaktom: Membranproteine (BRET) . . . . .	69
3.7	ORMDL Interaktom: relevante Chaperone (BRET) . . . . .	72
3.8	ORMDL Interaktom: $\gamma$ -Sekretase-Komplex (BRET) . . . . .	73
3.9	ORMDL Interaktom: peroxisomale Proteine (BRET) . . . . .	76
3.10	ORMDL Interaktom: Screen gegen zufällig ausgewählte Proteine (BRET) .	78
3.11	ORMDL und $\beta$ <sub>2</sub> -AR: Übersicht BRET <sub>50</sub> (BRET) . . . . .	83
3.12	$\beta$ <sub>2</sub> -AR-Allele: Übersicht BRET <sub>50</sub> (BRET) . . . . .	86
5.1	Referenzdatensatz für die Etablierung der Schwellenwerte (BRET) . . . .	125





# Zusammenfassung

Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) ist die Identifikation von Assoziationen zwischen Krankheiten und Allelen im gesamten Genom möglich. Die Beurteilung der Relevanz identifizierter Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), das bessere Verständnis der Pathogenese der assoziierten Erkrankung und die Identifikation neuer Therapieansätze erfolgt jedoch über die Kenntnis der Funktion des durch die Genmutation in Struktur, Menge oder Funktionalität veränderten Proteins. Ein Beispiel hierfür ist die 2007 erstmals beschriebene Assoziation zwischen kindlichem Asthma bronchiale und dem Genlocus von *ORM-like protein 3* (ORMDL3) auf dem Chromosomenabschnitt 17q21, die bei unbekannter ORMDL-Funktion zunächst zu keinem Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Pathogenese oder Therapie von Asthma führte. Asthma ist die häufigste chronische Erkrankung der Atemwege im Kindesalter, doch bisher stehen, auch aufgrund der noch unzureichend verstandenen Pathogenese, nur symptomatische Therapien zur Verfügung.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) Protein-Protein-Interaktionen (PPI) der ORMDL-Proteinfamilie zu identifizieren, um aus dem dadurch entstehenden explorativen Interaktom Rückschlüsse auf die Funktion der ORMDL-Proteine zu ziehen. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Interaktion zwischen ORMDL und dem  $\beta_2$ -Adrenorezeptor ( $\beta_2$ -AR) genauer analysiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden für die Erstellung eines Interaktoms von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mittels BRET insgesamt 471 PPI untersucht, wobei hypothesengetriebenen Interaktionspartner aus verschiedenen zellulären Funktionssystemen geprüft wurden. Es gelang der Nachweis einer Homo- und Heterooligomerisierung aller ORMDL-Proteine. Zudem wurden PPI zwischen ORMDL und humanen Homologen von in *Saccharomyces cerevisiae* bekannten Interaktionspartnern untersucht. Hier konnten aus 21 untersuchten PPI 12 positive identifiziert werden, darunter mit wichtigen Proteinen der Cholesterin- und Sphingolipidbiosynthese. Zudem wurde untersucht, ob ORMDL mit Membranrezeptoren interagiert. Hier waren 33 von 39 PPI positiv. Unter den immunologisch relevanten Proteinen waren 19 der 51 PPI positiv. Weiterhin wurde untersucht, ob ORMDL mit wichtigen Chaperonproteinen sowie Proteinen des Calciumstoffwechsels interagiert, wobei 47 von 81 PPI positiv waren. Von 7 untersuchten Proteinen des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes interagierten 6 mit allen ORMDL-Proteinen. Eine Testung gegen das peroxisomale Proteom ergab schließlich bei 126 getesteten PPI 24 positive. Insgesamt waren 45,4 % der 366 in den hypothesengetriebenen Untersuchungen

geprüften PPI positiv. In einem Kontrollexperiment mit Testung auf eine Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 oder ORMDL3 mit 35 zufällig ausgewählten Proteinen aus der in der eigenen Arbeitsgruppe etablierten cDNA-Bank waren es hingegen nur 1,9 %. Zusammenfassend konnten 168 PPI, davon über 155 erstmals, nachgewiesen werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Interaktion von ORMDL mit einem neu identifizierten Interaktionspartner, dem  $\beta_2$ -AR, genauer charakterisiert. Wir verifizierten die Interaktion mittels Co-IP und konnten mittels BRET zeigen, dass ORMDL3  $\beta_2$ -AR mit signifikant höherer Affinität bindet als ORMDL1 oder ORMDL2. Die Affinität von ORMDL3 zu  $\beta_2$ -AR hing dabei vom  $\beta_2$ -AR-Allelstatus ab und ließ sich durch Zugabe von in der Asthmatherapie relevanten  $\beta$ -Sympathomimetika beeinflussen. Aufgrund der ER-Lokalisation der ORMDL-Proteine und der zuvor nachgewiesenen Interaktionen mit Membranproteinen und Chaperonen untersuchten wir schließlich, ob ORMDL3 möglicherweise als akzessorisches Protein einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR ausübt. Im In-Cell/On-Cell ELISA konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von ORMDL3 die Menge des an der Zelloberfläche lokalisierten  $\beta_2$ -AR erhöht. Der Nachweis von Homo- und Heterooligomeren von ORMDL stärkt die Hinweise auf eine Assoziation auch von ORMDL1 und ORMDL2 und damit der gesamten ORMDL-Proteingruppe mit kindlichem Asthma und ist Teil einer Publikation, in der auch eine Assoziation von Polymorphismen der Promotorregionen von ORMDL1 und ORMDL2 mit der Erkrankung an Asthma nachgewiesen werden konnten. Auch der Nachweis eines beinahe identischen Interaktoms für ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 deutet auf eine gemeinsame Funktion und eine gemeinsame Assoziation mit Asthma hin. Insgesamt zeigt das explorative Interaktom, dass die ORMDL-Proteine als *date hub* Proteine mit komplexen Funktionen im endoplasmatischen Retikulum fungieren könnten. Die hypothesengestriebenen Untersuchungen bestätigen zugleich Interaktionen mit Proteinen des Calciumhaushalts, der Alzheimerpathogenese und der Spingholipidsynthese. Für diese Prozesse ist mittlerweile eine Beteiligung von ORMDL belegt. Der erstmalige Nachweis von Interaktionen zwischen den ORMDL-Proteinen und immunologisch relevanten Proteinen wie auch zahlreichen Membranrezeptoren, darunter der  $\beta_2$ -AR, macht zudem eine direktere Assoziation zwischen Asthma und ORMDL möglich. ORMDL3 zeigte einen Einfluss auf die Oberflächenexpression eines Membranrezeptors ( $\beta_2$ -AR) und seine Interaktion mit  $\beta_2$ -AR wird wiederum durch  $\beta$ -Sympathomimetika und die in der Pharmakogenetik von Asthma relevanten  $\beta_2$ -AR-Allele G16/Q27, R16/Q27 und G16/E27 beeinflusst. Dies ist ein neuer Ansatz für das Verständnis der komplexen ORMDL-Funktionen. Die Relevanz der gezeigten PPI mit Membranrezeptoren und insbesondere  $\beta_2$ -AR in der Krankheitsentstehung von Asthma wird durch weitere Untersuchungen der funktionellen Auswirkungen dieser Interaktionen geprüft.

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale stellt eine heterogene Gruppe von chronisch entzündlichen Erkrankungen der Atemwege dar, die durch bronchiale Hyperreagibilität und Bronchialobstruktion gekennzeichnet sind (Bousquet u. a. 2007, Siroux u. a. 2011, Martinez u. a. 2013). Klinisch präsentiert sich Asthma bronchiale durch wiederkehrende Episoden mit pfeifenden Atemgeräuschen (Tenero u. a. 2013), Giemen, Husten, paroxysmaler Dyspnoe mit expiratorischem Stridor und thorakalem Engegefühl (Li u. a. 1996, Papadopoulos u. a. 2012, Patadia u. a. 2014, Tarasidis u. a. 2015). Weltweit ist Asthma bronchiale die häufigste chronische Erkrankung der unteren Atemwege im Kindesalter (Lundback u. a. 2016, Milligan u. a. 2016, Pearce u. a. 2007). Die Erkrankung beginnt zumeist schon im Vorschulalter (Radhakrishnan u. a. 2014) und die Verläufe sind heterogen (Guilbert u. a. 2014, Piippo-Savolainen u. a. 2008). Schwere Asthmaverläufe haben einen großen Einfluss auf die Lebensqualität der erkrankten Kinder (Brand u. a. 2015) und führen zu enormen medizinischen und sozioökonomischen Belastungen (Dominguez-Ortega u. a. 2015). Die pathogenetischen Einflussfaktoren sind mannigfaltig, ebenso wie Klassifikationen und Forschungsansätze.

Zwar sind die zentralen Pathomechanismen chronische Entzündung, bronchiale Hyperreagibilität mit Bronchospasmus und *airway remodelling*, die krankheitsbedingten oder -bedingenden strukturellen Veränderungen der Atemwege, bekannt (Holgate 2008, Holgate 2011). Auch sind die entscheidend beteiligten Zellen des Immunsystems mit Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten identifiziert worden und das Konzept, dass der Asthmaentstehung Gen-Umwelt-Interaktionen zugrunde liegen, wird als richtig angenommen (Apter 2013, Blumenthal 2012, Custovic u. a. 2012, Kabesch 2014, Kauffmann u. a. 2012, Koppelman 2006, Lee u. a. 2015, Mutius 2009, Rava u. a. 2015, Rigoli u. a. 2011, Weiss 1999). Verschiedene Umweltfaktoren sind Tabakrauch (Ciaccio u. a. 2014, den Dekker u. a. 2015, Farber u. a. 2016, Ferrante u. a. 2014), Luftverschmutzung (Gehring u. a. 2015, Ierodiakonou u. a. 2016, Jacquemin u. a. 2015, Paramesh 2008) oder Atemwegsinfektionen (Costa u. a. 2014, Papadopoulos u. a. 2012, W. C. Tan 2005) sind

bereits bekannt. Die genauen genetischen Ursachen hingegen sind noch fast vollständig unklar (Moffatt u. a. 2007). Zwar lassen die etablierten Medikamente bei einem Großteil der Patienten eine gute Symptomkontrolle zu und evidenzbasierte, weltweit abgestimmte Leitlinien zur Therapie des Asthma bronchiale existieren (*International Consensus on Paediatric Asthma (ICON) on pediatric asthma*) (Bousquet u. a. 2007, Papadopoulos u. a. 2012), doch sind, auch aufgrund der unzureichend verstandenen Pathogenese, zur Zeit noch keine wirksame Prävention und keine kausalen und spezifischen kurativen Therapien möglich (Darveaux u. a. 2015, Papadopoulos u. a. 2012). Es bleiben denn auch bis zu einem Fünftel der Asthmaerkrankungen trotz optimaler medikamentöser Therapie unzureichend kontrolliert (Bush 2015, Cazzoletti u. a. 2007, Fitzpatrick u. a. 2012, Wenzel 2012). Somit ist ein genaueres Verständnis der Krankheitsentstehung des kindlichen Asthmas unerlässlich, um die symptomatische Therapie besser auf die heterogenen Krankheitsverläufe abstimmen und kurative Therapien für die einzelnen Asthmasyn-drome entwickeln zu können (Bagnasco u. a. 2016, Darveaux u. a. 2015, Fajt u. a. 2014, Grotenboer u. a. 2013, Ober u. a. 2011, Ortega u. a. 2013, Pijnenburg u. a. 2015, Portelli u. a. 2012).

### 1.1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Klassifikation

Weltweit sind zwischen 230 und 300 Millionen Menschen von Asthma bronchiale betroffen (Ferkol u. a. 2014, Masoli u. a. 2004, Pearce u. a. 2007, Zar u. a. 2014). In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz von Asthma wie auch die von Atopie und Allergien weiter zugenommen und beträgt in Industrieländern mittlerweile 5-16 % (Pearce u. a. 2007, Akinbami u. a. 2012), allerdings mit großen regionalen Unterschieden. So liegt die Prävalenz für Asthma in Schottland und weiteren Teilen des Vereinigten Königreichs bei 15,3-18,4 %, während sie in Deutschland 6,9 % und in Dänemark nur 3 % beträgt (Masoli u. a. 2004, Schmitz u. a. 2012). Es handelt sich bei der Erkrankung eher um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit unterschiedlicher Pathogenese, unterschiedlichen klinischen Verläufen und unterschiedlichen optimalen Therapiestrategien als um eine Entität. Diese Subtypen mit ihren noch unbekannten unterschiedlichen Pathomechanismen werden als Asthmaphänotypen bezeichnet (Siroux u. a. 2011). Eine Unterscheidung von Asthma im Kindes- sowie im Erwachsenenalter ist hierbei sinnvoll aufgrund der unterschiedlichen klinischen Phänotypen (de Nijs u. a. 2013, Larsen 2000). In älteren Klassifikationen wurden zwei Hauptformen des Asthma bronchiale hinsichtlich der Pathogenese unterschieden: das allergische Asthma und das nicht-allergische Asthma (Corren 2013, Handoyo u. a. 2009, Humbert u. a. 1999, H. Y. Kim u. a. 2010, Peters 2014, Scadding 2007, C. Walker 1993). Bei Krankheitsbeginn im Kindesalter ist die allergische Komponente häufig stärker ausgeprägt und es besteht eine Sensibilisierung gegen ein oder mehrere Allergene, die bei Exposition die Symptome auslösen (Sporik u. a. 1990, Wahn u. a. 1997). Moderne Ansätze gruppieren die Asthmaphänotypen eher multidimensional als in die einfache Dichotomie allergisch bzw. nicht-allergisch (Siroux u. a. 2011). So werden anhand einer Vielzahl von Merkmalen wie Alter, Atopie, Schwe-

regrad der Atemwegsobstruktion, Ansprechen auf Medikamente und Triggerfaktoren von Untergruppen abgegrenzt (Corren 2013, Siroux u. a. 2011). Auch eine Klassifikation über verschiedene vorherrschende Symptome ist möglich in die Gruppen Husten, Giemen und Atemnot, wobei die Gruppe der Kinder mit Atemnot durch eine längere Erkrankungsdauer, hohe Serum-IgE-Spiegel und ein gutes Ansprechen auf Kortison gekennzeichnet war, die Gruppe mit dem Hauptsymptom Husten dagegen jünger war, einen erhöhten Eosinophilen Spiegel aufwies und besonders gut auf die Therapie mit Montelukast ansprach und die Gruppe mit Giemen ein gemischtes Bild zeigte und auf beide Medikamente ansprach (Zedan u. a. 2013, Mantzouranis u. a. 2014). Aus der Einteilung in solche verschiedene Phänotypen ergibt sich die Hoffnung auf eine gezieltere Therapie der einzelnen Unterformen in Zukunft. Aus diesem Grund wurden in einem Expertenkonsens über die sieben Parameter klinische Charakteristik, Biomarker, Lungenfunktion, Genetik, Histopathologie, Epidemiologie und Therapieerfolg sechs Asthmaendotypen definiert, darunter Aspirin-sensitives Asthma, allergische bronchopulmonale Mykose, allergisches Asthma und eine schwere spät-beginnende hypereosinophile Form, denen wahrscheinlich verschiedene genetische und immun-pathologische Mechanismen zugrunde liegen (Lötvall u. a. 2011, Siroux u. a. 2011, Wenzel 2012).

Der allergische Asthmaphänotyp geht häufig einher mit Komorbiditäten wie atopischer Dermatitis, Nahrungsmittelallergien und chronischen Sinusitiden (Khan 2014, Paaso u. a. 2014, Shaker 2014). Innerhalb der Gruppe des allergischen Asthmas wird unterschieden in Formen des saisonalen allergischen Asthmas, das beispielsweise durch eine Monosensibilisierung gegen Pollen ausgelöst wird, und Formen des chronifizierten allergischen Asthmas, bei dem das ursprünglich sensibilisierende Allergen unter Umständen keine Rolle mehr spielt. In der Pathogenese des klassischen allergischen Asthmas wird die folgende Sequenz des Entzündungsprozesses angenommen: Die initiale Allergenexposition führt zur vermehrten Produktion und Ausschüttung von spezifischen IgE-Antikörpern. Diese fehlerhafte und überschießende IgE-Antwort wird durch das Überwiegen von Typ2-T-Helferzellen gegenüber Typ1-T-Helferzellen begünstigt (Fahy 2015). Entscheidend für die Entwicklung des Asthma bronchiale ist dann der chronische Entzündungsprozess der Atemwege (Galli u. a. 2008). Die Inflammation ist ein multizellulärer Prozess, der besonders auf der Aktivierung von Mastzellen, Eosinophilen, Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen beruht (Holgate 2011). Zum inflammatorischen Prozess tragen außerdem die glatten Muskelzellen der Bronchien sowie Epithelzellen bei (Holgate 2007). Gemeinsam verursachen sie durch Mediatoren des Immunsystems wie Chemokine und Zytokine ein inflammatorisches Milieu, das die chronische Entzündungsreaktion unterhält und zu strukturellen Veränderungen führt (Nakajima u. a. 2007, Renaud 2001). Es kommt zu einer Zunahme der Wandstärke der Bronchien, zu vermehrter Mukusproduktion, einer Epithelablösung, einer Hypertrophie der glatten Muskulatur, einer Hyperämie mit Vermehrung des Gefäßnetzes, einer Verbreiterung der Basalmembran und einer Abnahme der Elastizität der Atemwege (Al-Muhsen u. a. 2011, Fahy u. a. 2000, Harvey u. a. 2013, N. Hirota u. a. 2013, Lambrecht u. a. 2012). Diese Prozesse sind zunächst noch reversibel, mit zunehmender Dauer der Inflammation allerdings werden die Veränderungen permanent (Pascual u. a. 2009). Ob es

sich bei den strukturellen Veränderungen ausschließlich um eine Folge der chronischen Atemwegsinflammation handelt oder diese teilweise sogar vorausgehen, ist jedoch umstritten (Mantzouranis u. a. 2014). Der entscheidende Pathomechanismus in der Auslösung eines Asthmaanfalls ist dann der Bronchospasmus. Dieser kann in seltenen Fällen spontan auftreten, vor allem jedoch durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Reizen verursacht werden, die im Einzelnen abhängig sind vom Asthmaphänotyp (Malmström u. a. 2013). Für das allergische Asthma ist die durch den Kontakt mit einem spezifischen Antigen ausgelöste IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ1) mit der Degranulation von Mastzellen und dem durch die darin enthaltenen Mediatoren wie Histamine, Bradykinine oder Leukotrine ausgelösten Bronchospasmus entscheidend (Galli u. a. 2012, Stone u. a. 2010). Die bronchiale Hyperreagibilität auf unspezifische Reize auch im symptomfreien Intervall ist ein allgemeines Kennzeichen des Asthma bronchiale und lässt sich im Metacholin-Provokationstest auch bei circa 10 % der gesunden Population nachweisen (Hewitt 2008). Zusammen führen diese Mechanismen zur attackenartig verstärkten endobronchialen Obstruktion mit der Auslösung der typischen klinischen Symptome wie Giemen, Husten, Luftnot mit expiratorischem Stridor und thorakalem Engegefühl (Brand u. a. 2015, Papadopoulos u. a. 2012, van der Wiel u. a. 2014).

Für das kindliche allergische Asthma ist bekannt, dass schon im Vorschulalter der klinischen Manifestation episodisches Giemen und eine bronchiale Hyperreagibilität vorausgehen (Korppi u. a. 1994, Sears u. a. 2003, Stern u. a. 2008). Insbesondere Giemen während viraler Infektionen der oberen Atemwege ist eine häufige Erstmanifestation (Korppi u. a. 1994, Szefer u. a. 2014). Früh zeigen sich heterogene klinische Verläufe. Die meisten Asthmaerkrankungen sind durch eine milde Ausprägung der Symptomatik gekennzeichnet mit passageren, reversiblen Atemwegsobstruktionen ohne den Übergang in ein chronisches Asthmasyndrom und lassen sich mit den üblichen Medikamenten wie  $\beta$ -Sympathomimetika ambulant behandeln (Cazzoletti u. a. 2007). Ein kleiner Teil der Asthmasyndrome hingegen verläuft chronisch mit schweren, lebensbedrohlichen Asthmaanfällen (Cazzoletti u. a. 2007). Solche Verläufe sind gekennzeichnet durch eine Atemwegsobstruktion auch im anfallsfreien Intervall. Die Gruppe mit einer schweren Asthmaerkrankungen bereits im Kindesalter weist schon zum Zeitpunkt der Geburt eine verminderte Lungenfunktion und eine erhöhte bronchiale Reagibilität auf (S. W. Turner u. a. 2004, Mantzouranis u. a. 2014), möglicherweise bereits ein Zeichen des erhöhten genetischen Asthmarisikos, zeigt dann im Verlauf eine im Vergleich mit der Altersgruppe im Vorschulalter verminderte Zunahme der Lungenfunktion (Bisgaard u. a. 2012) und schließlich eine lebenslange, beschleunigte Abnahme der Lungenfunktion (A. L. James u. a. 2005, Strunk u. a. 2006).

### 1.1.2 Therapie

Obwohl es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt, die durch Umweltfaktoren in Kombination mit variablen, noch unbekannten genetischen Einflüssen ausgelöst werden, stellt sich die bisherige Asthmatherapie noch relativ unspezifisch

dar trotz der großen Erfolge in der symptomatischen Therapie von Asthmaanfällen (Papadopoulos u. a. 2012). Im Wesentlichen richten sich die Therapiestrategien gegen den Bronchospasmus - hier sind die Bronchodilatoren um die  $\beta$ -Sympathomimetika entscheidend (Lazarus 2010) - und gegen die chronische Inflammation der Atemwege - besonders durch die immunsuppressiven Kortikosteroide (Martinez u. a. 2013). Eine über die symptomatische Therapie hinausgehende kurative Behandlung dagegen ist nicht möglich (Holgate 2008; Holgate 2011). Dies lässt sich schon daran erkennen, dass sogar mit der ganz groben Trennung in zwei Hauptformen des Asthmas, allergisches und nicht-allergisches Asthma, keine unterschiedlichen Behandlungskonzepte verbunden sind (Raedler u. a. 2014). Eine auf die individuellen Phänotypen angepasste Therapiestrategie fehlt vollständig. In Bezug auf den Therapieerfolg werden verschiedene Stufen der Asthmakontrolle unterschieden. Eine komplette Asthmakontrolle bedeutet, dass keine Symptome und Exazerbationen auftreten und die Lungenfunktion, gemessen an der Einsekundenkapazität FEV1 und dem expiratorischen Spitzenfluss PEF über  $>80\%$  liegt. Eine gute Asthmakontrolle ist definiert als das Auftreten von Symptomen und Medikamentenbedarf an weniger als drei Tagen in der Woche und weniger als zwei Nächten im Monat sowie weniger als zwei Exazerbationen im Jahr bei guter Lungenfunktion (FEV1 und PEF  $>80\%$ ) (Cazzoletti u. a. 2007). Eine partielle Asthmakontrolle wird bei häufigeren Attacken und Exazerbationen sowie bei einer Einschränkung der Lungenfunktion (FEV1 und PEF zwischen  $60-80\%$ ) angenommen, während man bei kontinuierlichen Symptomen, wöchentlich auftretenden nächtlichen Symptomen, täglichem Gebrauch der Akutmedikation, extremer Einschränkung der täglichen Aktivitäten oder einer Lungenfunktion unter  $60\%$  von einem unkontrollierten Asthma spricht (Cazzoletti u. a. 2007, Papadopoulos u. a. 2012). Pro Kopf liegen die direkten und indirekten Kosten der Behandlung von Asthma bronchiale bei 445 - 2543 Euro pro Jahr (Kirsch u. a. 2013).

### 1.1.3 Gen-Umwelt-Interaktionen und Genomweite Assoziationsstudien

Asthma bronchiale ist eine der wichtigsten durch Gen-Umwelt-Interaktionen verursachten Erkrankungen (Apter 2013, Blumenthal 2012, Custovic u. a. 2012, Kabesch 2014, Kauffmann u. a. 2012, Koppelman 2006, Lee u. a. 2015, Mutius 2009, Ober u. a. 2011, Rava u. a. 2015, Su u. a. 2012, Weiss 1999, H. Wu u. a. 2007). Während die Beschreibungen der unterschiedlichen Asthmavarianten noch rein deskriptiv sind, sind hinsichtlich der verantwortlichen Umweltfaktoren verschiedene Triggerfaktoren bekannt: Atemwegsinfektionen (Costa u. a. 2014, W. C. Tan 2005), Schimmelbefall der eigenen Wohnung (Gent u. a. 2012, Hayes u. a. 2013, Karvonen u. a. 2015), Stress (Sandberg u. a. 2000, Turyk u. a. 2008, Wright u. a. 2002), Umwelt- und Luftverschmutzung und ein Leben in Großstädten (Gehring u. a. 2015, Ierodiakonou u. a. 2016, Jacquemin u. a. 2015, Paramesh 2008), niedriger sozialer Status (J. M. Chen u. a. 2010, Dales u. a. 2002, Kopel u. a. 2014, Largent u. a. 2012, Stevenson u. a. 2001) und Tabakrauchexposition (Ciaccio u. a. 2014,

den Dekker u. a. 2015, Farber u. a. 2016, Ferrante u. a. 2014, Ober u. a. 2011, Laußmann u. a. 2012, Schmitz u. a. 2012). Zudem gibt es protektive Faktoren wie das Aufwachsen in einem landwirtschaftlichen Betrieb (Lluis u. a. 2012, Rennie u. a. 2016, Wlasiuk u. a. 2012) in den ersten Lebensjahren sind bekannt (Martinez u. a. 2013) und es wird vermutet, dass der Kontakt des Immunsystems mit einem andersartigen und vielseitigen mikrobiellen Milieu dem protektiven Einfluss zugrunde liegt (Ege u. a. 2011, Wlasiuk u. a. 2012). Dass das Risiko, an Asthma zu erkranken, auch einem starken genetischen Einfluss unterliegt, wird seit Jahrzehnten vermutet, zumindest seitdem Coca und Cooke 1923 (Coca u. a. 1923) den Begriff der Atopie einführten, um das gemeinsame Merkmal der familiären Häufung und Vererbung von Allergien zu beschreiben, das die Krankheitsbilder Asthma, Nahrungsmittelallergien, allergische Rhinitis, atopische Dermatitis und Urtikaria umfasste (Dold u. a. 1992). So erhöht das Vorliegen von Asthma bronchiale bei Vater oder Mutter das Risiko eines Kindes, an Asthma zu erkranken, um das Dreifache (Laußmann u. a. 2012) und das Vorliegen von atopischem Ekzem oder Heuschnupfen verdoppelt das Risiko, später an Asthma zu erkranken (Laußmann u. a. 2012). Eine dominante oder rezessive Vererbung ließ sich in der Folge nicht nachweisen, und in zahlreichen Genkopplungsanalysen des gesamten Genoms zwischen 1986 und 2007 wurden schließlich eine Vielzahl von Genen und Suszeptibilitätsloci identifiziert, die Hinweise auf eine multifaktorielle Vererbung der heterogenen Erkrankung Asthma ergaben. Die Schätzungen zum hereditären Einfluss auf die Asthmaentstehung reichen von 35 % bis 95 %, für die bronchiale Übererregbarkeit von 30 % bis 60 % (Ober u. a. 2011). Häufig gefundene Suszeptibilitätsgene waren *IL4* (Rosenwasser u. a. 1995), *IL13* (van der Pouw Kraan u. a. 1999), *ADRB2* (Martinez u. a. 1997), *TNF* (Lykouras u. a. 2008), *HLADRB1* (Moffatt u. a. 2001), *FCER1B* (Hizawa u. a. 2000), *IL4RA* (Mitsuyasu u. a. 1998), *CD14* (Baldini u. a. 1999), *HLA-DQB1* (Torío u. a. 2003) und *ADAM33* (van Eerdewegh u. a. 2002, Shapiro u. a. 2002), bei allerdings geringer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in unterschiedlichen Studien und Populationen (Altmüller u. a. 2001). Eine mögliche Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse mag in der Heterogenität der Erkrankung liegen, sodass sich einzelne Gene nur als Risikofaktoren reproduzieren lassen, wenn der richtige Phänotyp für die Studienpopulation ausgewählt wurde (Siroux u. a. 2011). Eine große Schwäche der bisherigen genetischen Assoziationsstudien liegt in dieser ungenauen Charakterisierung der Studienpopulationen und ein großer Nachteil der Kandidatengen-Methoden ist die Abhängigkeit von *a priori*-Hypothesen, die zu einer weitgehenden Beschränkung auf für das Immunsystem relevante Gene führt (Ober u. a. 2011) und die Entdeckung unabhängiger und neuer Gene oder Krankheitsmechanismen über diese Methode ausschließt (Altmüller u. a. 2001).

Keines der möglichen Kandidatengene für die Vererbung des Asthmaerkrankungsrisikos ließ sich mit der neuen Methode der Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) bestätigen (Moffatt u. a. 2007). In GWAS werden über die Sequenzierung von 100.000 bis über 1.000.000 über das gesamte Genom verteilten Markern in einem klinisch genau beschriebenen Kollektiv Assoziationen zwischen SNP und Erkrankungen identifiziert. GWAS werden als Hypothesen-freie oder Hypothesen-generierende Suche nach genetischen Einflussfaktoren bezeichnet (Ober u. a. 2011). Dadurch entsteht wiederum das

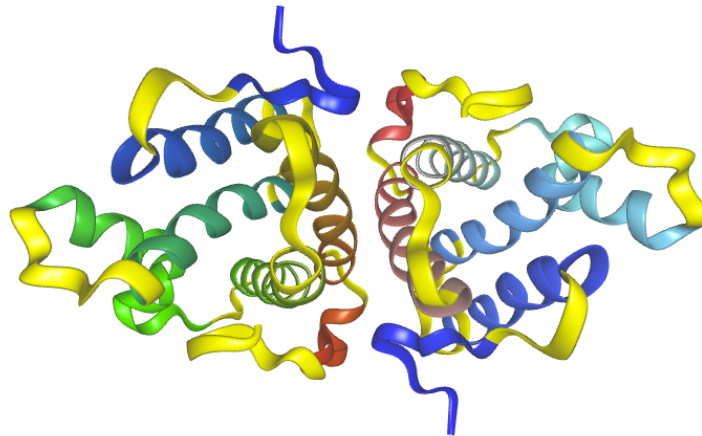


Problem, dass die Interpretation von gefundenen genetischen Risikofaktoren aufgrund von initial fehlenden offensichtlichen pathophysiologischen Verbindungen zwischen den neu identifizierten Genen, ihren bekannten Funktionen und den bisher angenommenen pathogenetischen Mechanismen der untersuchten Erkrankung Ober u. a. 2011 erschwert wird. In der ersten großen GWAS, beschränkt auf eine Population von 994 Kindern mit Asthma (und einer Reproduktion der Ergebnisse in einer Kohorte mit 5500 Kindern), konnten Moffat und Kabesch (Moffatt u. a. 2007) im Jahr 2007 nach der Charakterisierung von 317.000 SNP erstmalig zeigen, dass Veränderungen im Chromosomenabschnitt 17q21 mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an Asthma im Kindesalter einhergehen. In weiteren Experimenten konnte dieser Einfluss auf einen Polymorphismus in der Promoterregion von *ORMDL3* zurückgeführt werden, der zu einer erhöhten Expression von *ORM-like protein isoform 3* (*ORMDL3*) führt (Toncheva u. a. 2015, Wjst u. a. 2013). Die Assoziation von *ORMDL3* mit kindlichem Asthma konnte im Verlauf in zahlreichen weiteren Studien in unterschiedlichen Populationen belegt werden (Binia u. a. 2012, Bisgaard u. a. 2009, Bouzigon u. a. 2008, Denham u. a. 2008, Fang u. a. 2011, Galanter u. a. 2008, Halapi u. a. 2010, Kavalier u. a. 2012, Lluís u. a. 2011, Pinto u. a. 2008, Sleiman u. a. 2008, Tavendale u. a. 2008, H. Wu u. a. 2009). Eine Metaanalyse (Zhao u. a. 2014) aller 18 veröffentlichten Studien kam zu dem Schluss, dass die genetische Variation rs7216389 am Locus 17q21, der die Expression von *ORMDL3* kontrolliert, ein wichtiger und unabhängiger prädisponierender Faktor für die Entstehung von Asthma sowohl im Kindesalter als auch im Erwachsenenalter ist, insbesondere bei Asiaten und Kaukasiern. In einer Publikation unter Mitarbeit unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch *ORMDL1* (Chromosom 2q32) und *ORMDL2* (Chromosom 12q13) mit Asthma assoziiert sind (Toncheva u. a. 2015). Die Verknüpfung eines exogenen mit einem endogenen Risikofaktor gelang mit dem Nachweis, dass das gemeinsame Vorliegen der Polymorphismen im Chromosomenabschnitt 17q21 und Tabakrauchexposition im Kindesalter das Risiko, an Asthma zu erkranken, potenziert (Flory u. a. 2009). Auch ein Zusammenhang zwischen einem Asthmaphänotypen mit chronischem permanentem Giemen und dem SNP im Locus 17q21 konnte bereits nachgewiesen werden (Granell u. a. 2013). Schließlich konnte als Beleg für das genetisch erhöhte Asthmarisiko auch eine Assoziation zwischen dem SNP rs7216389 und bronchialer Hyperreagibilität bei Neugeborenen gezeigt werden (Bisgaard u. a. 2009). Bei den entdeckten SNP, die die Expression der *ORMDL*-Proteine beeinflussen, handelt es sich somit um die ersten nachgewiesenen und reproduzierbaren genetischen Risikofaktoren für die Entwicklung von allergischem Asthma im Kindesalter (Dijk u. a. 2013, Zhao u. a. 2014). Die *ORMDL*-Proteinfamilie allerdings war zum Zeitpunkt dieser Entdeckung noch fast vollständig unerforscht, ihre Funktion insbesondere in Bezug auf die bekannten Prozessen der Asthmapathogenese unbekannt, insbesondere auch, da die *ORMDL*-Gene keine bekannten funktionellen Domänen codieren (Hjelmqvist u. a. 2002).

## 1.2 Das neue Asthma-Risikogen ORMDL

Bei den Proteinen der ORMDL-Proteinfamilie handelt es sich um drei 153 Aminosäuren lange, endoplasmatische Membranproteine. Erstmalig wurde diese Proteinfamilie im Jahr 2002 beschrieben (Hjelmqvist u. a. 2002). Aus dieser Arbeit stammen grundlegende Erkenntnisse über die ORMDL-Proteine. ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 werden im menschlichen Körper ubiquitär exprimiert, sind zueinander 80-84 % homolog und auch evolutionär hoch konserviert, zum Beispiel in *Mus musculus*, *Takifugo ruripes*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und weiteren Spezies (Hjelmqvist u. a. 2002). Mit GFP markiertes ORMDL wurde ins endoplasmatische Retikulum (ER) lokalisiert (Hjelmqvist u. a. 2002). Außer vier putativen Membrandomänen bei allen Mitgliedern der Proteinfamilie trägt ORMDL keine bekannten funktionellen Domänen. Abbildung 1.3 zeigt eine mit I-TASSER erstellte Prädiktion der Tertiärstruktur mit den vier erkennbaren Transmembrandomänen (Yang u. a. 2015).

Die Deletion beider *ORMDL*-homologen Gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Orosomuco-*



**Abbildung 1.1:** Tertiärstrukturprädiktion eines ORMDL3-Homooligomers, erstellt mit I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) (Yang u.a. 2015)

*id 1* (*ORM1*) und *ORM2*, ist nicht letal, führt allerdings zu deutlich verlangsamtem Zellwachstum. Des Weiteren zeigen *double knock-out*-Zelllinien (Zelllinien, in denen sowohl *ORM1* als *ORM2* fehlen) eine erhöhte Sensibilität auf zahlreiche Zellgifte wie beispielsweise Dithiothreitol, Tunicamycin, Quecksilberchlorid oder Cycloheximid. Dies gilt nicht für die entsprechenden *single knock-out*-Zelllinien. Die erhöhte chemotoxische Empfindlichkeit lässt sich in *Saccharomyces cerevisiae* durch die Transfektion von humanem *ORMDL3* teilweise aufheben, so dass nicht nur die Aminosäuresequenz evolutionär konserviert ist, sondern dies wahrscheinlich auch auf die Funktion zutrifft (Hjelmqvist u. a. 2002).

Fünf Jahre nach der Arbeit von Hjelmqvist und Kollegen erschien die erste Veröffentlichung, in der eine mögliche ORMDL-Funktion genauer untersucht wurde (Araki u. a. 2007). Es wurden Mutationen in *Presenilin 1* (*PSEN1*) identifiziert, die zu einer um 66 % verminderten Expression von ORMDL1 mRNA führen. Auch ORMDL2 und ORMDL3 mRNA wurde weniger stark exprimiert, was allerdings keinen Einfluss auf die Proteinmenge von ORMDL hatte. PSEN1 ist Teil des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes, der für die intramembranöse Spaltung von Amyloid-Vorläuferprotein (*Amyloid precursor protein*) (APP) und weiteren Typ-1-Membranproteinen zuständig ist. PSEN1 bildet das katalytische Zentrum des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes und *PSEN1*-Mutationen sind mit der Entstehung der Demenz vom Alzheimer-Typ vergesellschaftet, da durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex beim Abbau von APP A $\beta$ 40 und das zu amyloiden Plaques führende A $\beta$ 42 entstehen. Araki und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 im zentralen Nervensystem hauptsächlich in Neuronen lokalisiert sind, posttranslational kaum modifiziert werden und dass die Expression von ORMDL in *PSEN1*-defizienten Zellen erhöht ist. Wird dagegen ORMDL durch siRNA ausgeknockt, so inhibiert dies die Funktion des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes, wodurch die Menge an A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 in der Zelle sinkt. Es wurde der Schluss gezogen, dass die ORMDL-Proteine unter der transkriptionellen Kontrolle von PSEN1 stehen, die Funktion des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes beeinflussen können und damit einen Einfluss in der Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ haben könnten (Araki u. a. 2007).

Die erste Veröffentlichung, die auf Proteinebene einen Zusammenhang zwischen Asthma bronchiale und ORMDL aufzeigte, wurde 2010 publiziert. Es wurde der Einfluss von ORMDL auf den Calciumhaushalt der Zelle, die *Unfolded Protein Response* (UPR) und Inflammation untersucht (Cantero-Recasens u. a. 2009). Die subzelluläre Verteilung von ORMDL3 als ER-Protein wurde bestätigt, wobei nur zwei Transmembrandomänen identifiziert wurden. C- und N-Terminus lagen zytosolisch. Eine Koimmunpräzipitation legte eine direkte Interaktion zwischen ORMDL und einer Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) nahe. Die Überexpression von ORMDL3 in humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293 und Jurkat-Zellen verringert die Aktivität von SERCA, einer in ER-Membran liegenden Calcium-Pumpe, die Calcium aus dem Zytosol in den Speicher (ER) zurück transportiert, und führt so zu einer Verlangsamung der Entfernung von Calcium aus dem Zytosol nach einer Stimulation der Zelle mit Carbachol. Nach einem Gen *knock-out* von ORMDL3 mittels siRNA dagegen ist die SERCA-Aktivität erhöht. Da eine Verringerung der Calcium-Konzentration im ER die UPR aktiviert, zeigte sich folglich bei ORMDL3-Überexpression eine stärkere Aktivierung der UPR. Somit konnte eine Verbindung zwischen ORMDL3, SERCA und dem Calcium-Stoffwechsel der Zelle hergestellt und darauf aufbauend die Veränderung der UPR durch ORMDL3 gezeigt werden, die wiederum eine mögliche Rolle von ORMDL3 in der Entstehung von Entzündungsreaktionen aufzeigt (Cantero-Recasens u. a. 2009). In zwei Arbeiten im Jahr 2010 wurde der Einfluss von ORM1 und ORM2 auf den Sphingolipidstoffwechsel in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht (Breslow u. a. 2010, S. Han u. a. 2010). Breslow und Kollegen beschreiben, wie ORM1 und ORM2 die Biosynthese von Sphingolipiden steuern, indem sie den ersten Schritt in der Synthese regulieren.

Eine Untersuchung möglicher ORM-Funktionen erfolgte zunächst über den Vergleich von *Epistatic Mini-Array Profiles* (EMAPS), in denen sich ein gegensätzliches Verhalten der genetischen Interaktionsmuster nach *ORM2-knock-out* bzw. *LCB1-* und *LCB2-*Funktionsverlust zeigte, was auf gegensätzliche zelluläre Funktionen hinweist. *LCB1* und *LCB2* bilden eine heterodimere Serin-Palmitoyltransferase (SPT), die den ersten Schritt der Sphingolipidsynthese katalysiert, in dem Serin und Fettsäuren zu Sphingosinen verbunden werden. Folglich war die Lipidzusammensetzung von Zellen, die *ORM1* oder *ORM2* überexprimieren, durch eine Reduktion der Menge an Sphingosinen und Ceramiden verändert, während ein Gen *knock-out* von *ORM* zur Erhöhung der Mengen von Sphingosinen, Ceramiden und fertigen Sphingolipiden führte. Eine Inhibition von *LCB1* und *LCB2* wiederum führt zur Aufhebung der Wachstumsstörung, die *ORM1/ORM2* negative Zellen zeigen (Hjelmqvist u. a. 2002). Zudem wurden Interaktionen zwischen *ORM1* und *ORM2* sowie *LCB1*, *LCB2*, *SAC1* und *TSC3* gefunden, die einen höhermolekularen Komplex bilden könnten, in dem die *ORM*-Proteinfamilie die SPT negativ reguliert. Diese Regulation unterliegt einer feinen Steuerung, denn die Inhibition von *LCB1* und *LCB2* durch steigende Konzentrationen an Myriocin führt nicht sofort zur Abnahme der Biosynthese von LCB und damit von Sphingolipiden, sondern zunächst zu einer zunehmenden Deaktivierung von *ORM* bei konstant bleibender Sphingolipidbiosynthese, bis schließlich die *ORM*-Funktion gänzlich aufgehoben ist und die Sphingolipidbiosynthese durch die Inhibition von SPT abnimmt. Die Deaktivierung von *ORM*, das sich dann stärker perinukleär und nicht mehr peripher im ER befindet und weniger stark zu Homo- und Heterooligomerisierung neigt, wird über die posttranslationale Phosphorylierung gesteuert. Breslow und Kollegen kommen zu dem Schluss, dass es sich bei der *ORM*-Proteinfamilie um dynamische negative Regulatoren der SPT handelt, deren inhibitorische Funktion von adäquaten Mengen an nachgeschalteten Sphingolipiden abhängt. Auch Han und Kollegen zeigen in ihrer Arbeit, dass *ORM* die Sphingolipidbiosynthese regulieren, da *ORM*-defiziente Zellen eine erhöhte Konzentration an Sphingosinen aufweisen und sich der *ORM-knock-out*-Phänotyp durch die Inhibition der Sphingolipidbiosynthese normalisieren lässt (S. Han u. a. 2010). Sie konnten zudem nachweisen, dass die UPR in *ORM*-defizienten Zellen konstitutiv stärker aktiviert ist, dass die *ORM2*-Expression durch die UPR gesteigert wird und dass *ORM*-defiziente Hefezellen ein verlangsamtes Trafficking vom ER zum Golgi-Apparat zeigen. Zudem konnte die direkte Interaktion von *ORM1* und *ORM2* mit *LCB1* bestätigt werden. Ausgehend von diesen neuen Funktionen der *ORM*-Proteinfamilie stellt sich die Frage, ob der Sphingolipidstoffwechsel einen Einfluss auf die Entstehung von Asthma im Kindesalter haben könnte (Breslow u. a. 2010, S. Han u. a. 2010).

Schließlich zeigt eine Arbeit von Miller und Kollegen aus dem Oktober 2012 einen dritten möglichen Zusammenhang zwischen *ORMDL* und Asthma auf (Miller u. a. 2012). Zunächst konnte eine 127-fache Steigerung der *ORMDL3* mRNA-Expression in murinen Zellen des Atemwegstrakts durch eine Stimulation der Tiere mit dem Allergen *Alternaria* nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich *in vitro* auch in einer humanen Alveolarzelllinie A549 nachvollziehen. Im Gegensatz dazu war die *ORMDL1* mRNA-Expression unverändert und die *ORMDL2* mRNA-Expression nur schwach er-

hört. Unter Verwendung eines unspezifischen Antikörpers gegen ORMDL wurde auch die ORMDL-Proteinexpression untersucht. Besonders murine Alveolarepithelzellen exprimierten ORMDL *in vivo* und reagierten mit einer Erhöhung der Expression auf einen Allergenstimulus, nicht hingegen Fibroblasten oder glatte Muskelzellen. Eine erhöhte ORMDL-Expression ließ sich auch in Eosinophilen und Makrophagen der murinen Lunge nachweisen, nicht aber in neutrophilen Granulozyten. Eine Erhöhung der ORMDL3 mRNA-Expression in Bronchialzellen konnte auch durch Interleukin (IL)-3 und IL-4, nicht aber durch TNF $\alpha$ , ausgelöst werden. Dies ist abhängig von STAT6, dagegen hat ein Defekt in der NF $\kappa$ B-abhängigen Signalkaskade keinen Einfluss. ORMDL3 wiederum erhöht nach Überexpression in humanen bronchialen Epithelzellen die mRNA-Expression von Metalloproteasen und Chemokinen. Darüber hinaus aktiviert die ORMDL3-Überexpression in A549 über den aktivierenden Transkriptionsfaktor 6 (ATF6) die UPR. Für ATF6 ist eine Steigerung der Expression von Sarcoplasmatisches/Endoplasmatisches Reticulum Calcium-ATPase (SERCA) bekannt, und in Einklang hiermit ergab sich bei ORMDL3-Überexpression schließlich auch eine gesteigerte mRNA- und Protein-Expression von SERCA. Zusammenfassend zeigte die Arbeit von Miller und Kollegen erstmals, dass die ORMDL3-Expression in den Atemwegen Allergen-induziert hochreguliert werden kann und Gene asthmarelevanter Metalloproteasen und Chemokine aktiviert. Zwar wird hier ebenfalls gezeigt, dass ORMDL3 die UPR regulieren kann, allerdings weisen Miller und Kollegen eine Steigerung der SERCA-Expression nach, während Cantero-Recasens und Kollegen eine Inhibition der SERCA-Aktivität durch ORMDL3 gezeigt hatten. (Cantero-Recasens u. a. 2009, Miller u. a. 2012).

Dieser Überblick über die bisher veröffentlichten Forschungsarbeiten zu den Funktionen von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 macht deutlich, dass einige Eigenschaften der Proteinfamilie wie z. B. die subzelluläre Verteilung hauptsächlich in der Membran des ER oder die evolutionäre Konservierung von Funktion und Form mittlerweile als gesichert gelten dürfen. Hingegen bleibt die funktionelle Relevanz von ORMDL besonders hinsichtlich einer Erklärung des erhöhten Asthmarisikos durch eine verstärkte Expression von ORMDL noch unklar. Die bisher nachgewiesenen Funktionen sprechen für ein breites Spektrum an möglichen zellulären Prozessen und Signalkaskaden, die durch ORMDL beeinflusst werden, wie die Regulation des Calciumhaushalts, der UPR, des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes und der Sphingolipidsynthese, oder ORMDL beeinflussen, wie die Expression von ORMDL in Alveolarzellen unter dem Einfluss von Allergenen, jedoch ohne eine schlüssige Verbindung zur Asthmapathogenese aufzuweisen.

## 1.3 Der $\beta_2$ -Adrenorezeptor

Während ORMDL erst seit kurzem im Fokus der Forschung zu Asthma im Kindesalter steht, ist der im Rahmen dieser Dissertation ebenfalls untersuchte  $\beta_2$ -Adrenorezeptor ( $\beta_2$ -AR) ein in zahlreichen Publikationen untersuchtes Ziel der Pathophysiologie und

besonders der Pharmakotherapie von Asthma bronchiale. Pharmaka, die auf den  $\beta_2$ -AR wirken, werden seit mehr als 100 Jahren in der Asthmatherapie verwendet (Solis-Cohen 1900). Adrenerge Rezeptoren werden in drei Gruppen eingeteilt:  $\alpha_1$ -Rezeptoren,  $\alpha_2$ -Rezeptoren und  $\beta$ -Rezeptoren ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ). Sie werden in allen Organsystemen des Körpers exprimiert und vermitteln insbesondere den Einfluss des sympathischen autonomen Nervensystems auf diese Organe über die Wirkung der Katecholamine. Aufgrund seiner Lokalisation in den Bronchien ist  $\beta_2$ -AR der mit Abstand bedeutendste der adrenergen Rezeptoren hinsichtlich des bronchialen Asthmas.

$\beta_2$ -AR wird auf Chromosom 5q31-32 codiert und gehört zu der wichtigen Klasse der G-Protein gekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptoren (GPCR), aufgebaut aus sieben transmembranösen  $\alpha$ -Helices. Diese Rezeptorklasse ist das Ziel von über 50 % aller heute genutzten Medikamente und stellt die entscheidenden Rezeptoren für Transmitter wie Katecholamine, Acetylcholin, Opioide, Dopamin, Histamine oder Somatostatine. Es handelt sich bei dem den  $\beta_2$ -AR codierenden  $\beta_2$ -Adrenorezeptor (*ADRB2*) um ein intronloses extrem polymorphes Gen (Kobilka u. a. 1987b, Kobilka u. a. 1987a, Drysdale u. a. 2000), für dessen Entdeckung und Erforschung Brian Kobilka und Robert Lefkowitz 2012 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten. Es codiert für ein Protein mit einer Länge von 413 Aminosäuren und einem Gewicht von ca. 46.500 Dalton.  $\beta_2$ -AR hat vier extrazelluläre Domänen (darunter der N-Terminus) und vier intrazelluläre Domänen (darunter der C-Terminus). Die Signaltransduktion über ein stimulierendes G-Protein führt eher zur Erhöhung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wobei die aktivierte Signalkaskade schließlich zu Erniedrigung des intrazellulären Calciumspiegels und damit einer Verminderung des Muskeltonus in den glatten Muskelzellen der Atemwege führt (Johnson 1990). Dies macht den  $\beta_2$ -AR zum bevorzugten Ziel in der Asthmatherapie, da dieser Mechanismus der Muskelrelaxation die Aufhebung der Bronchialobstruktion ermöglicht.  $\beta_2$ -AR beeinflussen auch weitere Prozesse wie die cholinerge Signalübertragung, die mukoziliäre Clearance oder die Mediatorenfreisetzung aus basophilen Granulozyten und Mastzellen (Hizawa 2009). Entsprechend sind inhalative selektive  $\beta_2$ -Agonisten die am häufigsten eingesetzten Medikamente in der akuten Kontrolle der Asthmaexazerbation.

$\beta_2$ -AR wird an der Zelloberfläche exprimiert, allerdings nur in geringer Anzahl (Panebra u. a. 2010), wobei glatte Muskelzellen der Atemwege mit circa 30.000-40.000 Rezeptoren die höchste Dichte aller Zellen an der Zelloberfläche aufweisen (Johnson 2006). Auf Epithelzellen, alveolären Typ II-Zellen, Mastzellen und Endothelzellen findet sich der  $\beta_2$ -AR auch, jedoch in geringerer Rezeptordichte (Johnson 2006). Besonders stark wird  $\beta_2$ -AR in den distalen Atemwegen exprimiert, wobei sich kein Unterschied in der Rezeptordichte zwischen Gesunden und Asthmatikern finden lässt (Johnson 2006).

Zum jetzigen Zeitpunkt scheint es, als seien *ADRB2*-Polymorphismen nicht für die Pathogenese von Asthma relevant (I. P. Hall u. a. 2006, Hizawa 2009, Postma u. a. 1995, Postma u. a. 2005, Summerhill u. a. 2000), denn in einer großen Studie mit 8.018 Teilnehmern der britischen Geburtenkohorte von 1958 waren in der Folgeuntersuchung nach 45 Jahren weder die Asthmaprävalenz noch die Asthmaprognose noch die Lungenfunktion mit Polymorphismen im  $\beta_2$ -Adrenorezeptor assoziiert (I. P. Hall u. a. 2006). Es

fand sich nur ein kleiner Effekt der Arg16- und Glu27-Allele, deren Träger bei Giemen im Kindesalter später häufiger eine Asthmapersistenz zeigten. Die Polymorphismen Arg26Gly (ADRB2-rs1042713) und Glu27Gly (ADRB2-rs1042714) des  $\beta_2$ -AR sind die am häufigsten untersuchten Varianten, für die in kleineren Studien zahlreiche Assoziationen mit Asthma gefunden worden waren. Das Gly16-Allel war assoziiert mit erhöhtem Kortikosteroidgebrauch (Reihsaus u. a. 1993), nächtlichem Asthma (Santillan u. a. 2003, Turki u. a. 1995) und schwerem Asthma (Holloway u. a. 2000, S. W. Turner u. a. 2004). Das Arg16-Allel war assoziiert mit einer schlechteren Lungenfunktion (Summerhill u. a. 2000). Das Glu27-Allel war assoziiert mit einer geringeren Rate an kindlichem Asthma (Hopes u. a. 1998). Zumindest für die beschriebene britische Geburtenkohorte lassen sich diese Ergebnisse jedoch nicht replizieren (I. P. Hall u. a. 2006). Auch wenn die Ergebnisse hinsichtlich des Risikos, an Asthma zu erkranken, nicht eindeutig sind, so haben Polymorphismen im *ADRB2*-Gen sicher einen Einfluss auf die bronchiale Reagibilität. Patienten mit dem Gly16-Allel haben beispielsweise eine stärkere bronchiale Hyperreagibilität auf Metacholin als Arg16-homozygote Patienten (Fowler u. a. 2000). Patienten mit dem Glu27-Allel haben eine geringere bronchiale Hyperreagibilität als Gln27-homozygote Patienten (I. Hall u. a. 1995, Ramsay u. a. 1999). Und sogar bei gesunden Probanden fand sich ein Zusammenhang zwischen dem Arg16-Allel und einer reduzierten Bronchokonstriktion auf einen Metacholinreiz (Fukui 2006). Zudem sind die Wechselwirkungen von *ADRB2*-Polymorphismen mit Umweltfaktoren, die unterschiedliche Verteilung in ethnischen Gruppen und die Interaktion mit Polymorphismen in anderen Asthma-relevanten Genen noch unzureichend verstanden. Auch gibt es Hinweise darauf, dass *ADRB2*-Polymorphismen durchaus den Krankheitsverlauf von Asthma bronchiale und den Therapieerfolg mit kurz- und langwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika insbesondere in der chronischen Anwendung beeinflussen (Nelson u. a. 2006). Eine Vorhersage des Krankheitsverlaufs und der  $\beta$ -Sympathomimetikawirkung ausgehend vom *ADRB2*-Genotyp oder *ADRB2*-Haplotyp würde einen großen Schritt in Richtung einer personalisierten Asthmatherapie ermöglichen (Hizawa 2009), um beispielsweise Ergebnisse wie den Studienabbruch einer großen Studie, in der eine afroamerikanische Patientengruppe mit dem langwirksamen  $\beta_2$ -Agonisten Salmeterol behandelt wurde und es zu einer höheren Rate an Todesfällen und schweren Asthma-assoziierten Zwischenfällen kam (Nelson u. a. 2006), in Zukunft zu verhindern.

## 1.4 Protein-Protein-Interaktionen

Eine der größten Aufgaben der Biowissenschaften ist die Entschlüsselung, Erklärung und Vorhersage von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen (Chong u. a. 2015, Vidal 2016). Die Entschlüsselung des humanen Genoms ist vollständig gelungen (Ahn u. a. 2009, Lander u. a. 2001, Venter u. a. 2001, J. Wang u. a. 2008) und die Sequenzierung des gesamten Exoms oder sogar Genoms sowie GWAS zur Suche nach neuen pathogenen Mutationen (E. Chen u. a. 2010, Maltsev u. a. 2013, Ng u. a. 2010, Visscher u. a. 2012, Worthey u. a. 2011) oder klinischen Risikofaktoren (Ashley u. a. 2010) sind zunehmend

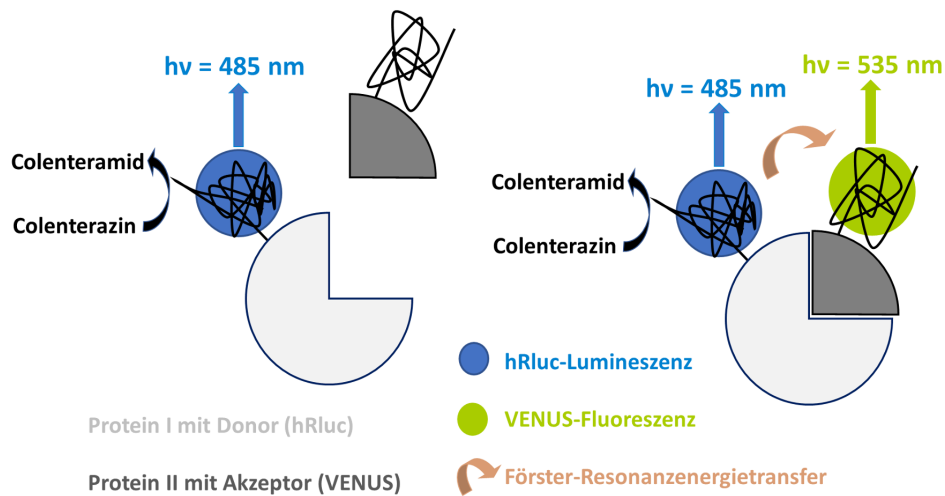
möglich. Umso bedeutender wird damit die funktionelle Charakterisierung der identifizierten krankheitsrelevanten Gene auf Proteinebene (Cooper u. a. 2011, Edwards u. a. 2013). Obwohl nur 1 % des humanen Genoms aus Protein-codierenden Regionen besteht, sind die überwältigende Mehrheit aller nach den Mendelschen Regeln vererbten Phänotypen bedingt durch Veränderungen in Proteinfunktion, Proteinlokalisierung oder Proteinmenge (Chong u. a. 2015, Makrythanasis u. a. 2013). So kommt der Analyse von Protein-Protein-Interaktion (PPI) eine zentrale Bedeutung für das Verständnis zellulärer Prozesse zu (Edwards u. a. 2013, Rolland u. a. 2014, Vidal 2016), da eine Vielzahl von Proteinen ihre Funktionen innerhalb großer Proteinkomplexe und nur in Interaktionen mit anderen Proteinen ausüben (Barabási u. a. 2011, Vidal 2016). Auch alle bekannten und wichtigen zellulären Signalkaskaden werden über PPI vermittelt (Clancy u. a. 2014). Die Gesamtheit aller PPI innerhalb des Proteoms eines Organismus wird als Protein-Interaktom oder einfach als Interaktom bezeichnet (Gavin u. a. 2002). Für das humane Interaktom wird eine Größe von mehreren hunderttausend binären Interaktionen angenommen (Rual u. a. 2005, Hart u. a. 2006, Stumpf u. a. 2008, Rolland u. a. 2014). Analog zur Entschlüsselung des gesamten Genoms von Modellorganismen (Adams u. a. 2000) ergibt sich als nächster Schritt die Entschlüsselung des gesamten Interaktoms von Modellorganismen sowie menschlicher Organellen (Stuart u. a. 2007) und schließlich des gesamten Interaktoms, um die komplexen Netzwerke zu verstehen, in denen Proteine ihre Funktionen ausüben und somit auch Rückschlüsse auf Proteinfunktionen, die Pathogenese von Erkrankungen und mögliche Therapiestrategien zu ziehen (Vidal 2016). Diese Proteinnetzwerke dienen in zunehmendem Maße als Werkzeuge, um neue Proteinfunktionen aufzudecken und die molekularen Mechanismen von Erkrankungen zu entschlüsseln (Ideker u. a. 2008, Novarino u. a. 2014, Vidal u. a. 2011). Zudem häufen sich entsprechend der *disease module hypothesis* (Barabási u. a. 2011, Menche u. a. 2015) zelluläre Komponenten, die mit einer bestimmten Erkrankung assoziiert sind, sowie Komponenten ähnlicher Erkrankungen innerhalb von Unterregionen des Interaktoms. Noch allerdings sind mit nur circa 45.000 der wahrscheinlich mehr als 600.000 humanen PPI weniger als 10 % des humanen Interaktoms durch Daten von hoher Qualität belegt (Rolland u. a. 2014, Stumpf u. a. 2008, Venkatesan u. a. 2009, Vidal 2016). Ein Beispiel für ein Protein, für das auf genetischer Ebene eine pathogene Mutation identifiziert wurde, aber auf Proteinebene zum Zeitpunkt der Entdeckung weder aussagekräftige PPI noch bekannte Funktionen noch ein Pathomechanismus verfügbar waren ist ORMDL3. Eine Vielzahl von verschiedenen biochemischen Methoden existieren für die Untersuchung von PPI, u.a. *Yeast Two-Hybrid* Systeme, Koimmunpräzipitation (Co-IP), Affinitätschromatographie, Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) und Enzymfragment-Komplementation (Syafrizayanti u. a. 2014). Auf der Ebene der Hochdurchsatz-Testung des gesamten Proteoms sind *Yeast Two-hybrid* Systeme von entscheidender Bedeutung (Uetz u. a. 2000b, Vidal 2016). Die erste Publikation, die einen Ausschnitt aus dem gesamten Interaktom zeigte und die Darstellung in der Form von Netzwerken mit den einzelnen Proteinen als Knotenpunkten und den PPI als Verbindungslinien etablierte, erschien im Jahr 2000 (Uetz u. a. 2000a). Weitere Arbeiten haben das humane Interaktom untersucht (Rolland u. a. 2014, Rual u. a.



2005, Stelzl u. a. 2005), aber auch für zahlreiche andere Organismen wie *Herpes simplex* (Uetz u. a. 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (Tarassov u. a. 2008) und *Drosophila melanogaster* (Giot u. a. 2003, Guruharsha u. a. 2012) liegen große PPI-Screens vor. Die bekannten Interaktionen sind in Datenbanken wie BioGrid (Stark u. a. 2006), Ensembl (Cunningham u. a. 2015) oder BIND (Willis u. a. 2006) zugänglich. Die Darstellung der PPI in Form von Verbindungslinien macht eine intuitive Erfassung der Netzwerkarchitektur möglich, doch täuscht sie auch eine Genauigkeit vor, die *Yeast Two-hybrid* Systeme nicht ermöglichen. Die Interaktion zwischen zwei Proteinen kann durch ein drittes vermittelt und damit indirekt sein, sie unterliegt zumeist einer raschen zeitlichen Dynamik, die nicht abgebildet wird (Johnsson 2014), und sie kann auf subzelluläre Kompartimente, einzelne Zellen oder Gewebe beschränkt sein. Die großen Interaktomstudien (Rolland u. a. 2014; Rual u. a. 2005; Stelzl u. a. 2005) erreichen zudem nur positive prädiktive Werte zwischen 60 % und 78 %, bei Wiederholungstestungen zur Validierung sogar nur 27 % bis 31 % (Lemmens u. a. 2010). Im Vergleich unterschiedlicher *Yeast Two-hybrid*-Studien mit anderen Methoden zur Untersuchung des Interaktoms lassen sich Interaktionen zum Teil nur in 10 % der Fälle bestätigen (Braun u. a. 2008). Während für die Untersuchung großer Interaktome Hochdurchsatzverfahren wie *Yeast Two-hybrid* Systeme weiterhin alternativlos sind trotz der dargelegten Nachteile einer hohen Anzahl von falsch-positiven und falsch-negativen Interaktionen, bietet BRET für kleine und mittlere Größenordnungen einige bedeutende Vorteile (Gersting u. a. 2012).

### 1.4.1 Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) ist ein Phänomen, das natürlicherweise in der Ortokorallenart *Renilla reniformis* vorkommt (Ward u. a. 1979). Wenn diese Seefedernart gereizt wird, erzeugt sie mit Hilfe des Enzyms Renilla-Luciferase, des Substrats Colenterazin (CTZ) und einer Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) über BRET Licht der Wellenlänge  $\lambda$  509 nm (Ward u. a. 1979). Der Mechanismus des Biolumineszenz-Resonanzenergietransfers wiederum basiert auf dem Förster-Resonanzenergietransfer, bei dem strahlungsfrei Energie übertragen wird zwischen einem Donor- und einem Akzeptorprotein (Pfleger u. a. 2006a). Die Höhe des Energietransfers ergibt sich aus dem Verhältnis von Akzeptor- zu Donorsignal (Y. Xu u. a. 1999). Wenn sich Donor- und Akzeptorprotein nicht in großer räumlicher Nähe befinden, so lässt sich nach Zugabe des Substrats lediglich das emittierte Spektrum der Renilla-Luciferase, des Donorproteins, nachweisen. Befindet sich hingegen das Akzeptorprotein in einem Abstand von weniger als 10 nm, so nimmt durch die strahlungsfreie Energieübertragung auf das Akzeptorprotein das Donorsignal ab und es lässt sich eine Lichtemission im Spektrum des Akzeptorproteins nachweisen (Pfleger u. a. 2006a, Y. Xu u. a. 1999). Da dieser Abstand von maximal 10 nm vergleichbar ist mit den natürlich vorkommenden Distanzen zwischen Proteinen in Proteinkomplexen, kann dieses biophysikalische Phänomen für die Untersuchung von PPI genutzt werden. Das BRET-Paar humanisierte Renilla Luciferase (hRluc) und gelb fluoreszierendes Protein (YFP) hat einen Förster



**Abbildung 1.2:** Funktionsprinzip der BRET-Methode: zwei Proteine sind rekombinant mit dem Energiedonor (hRluc) oder dem Energieakzeptor (Venus) verbunden worden. Wenn diese Proteine miteinander interagieren, so ist nach der Zugabe des Substrats CTZ durch den strahlungsfreien Förster-Resonanzenergietransfer nicht nur die hRluc-Lumineszenz bei 485 nm, sondern auch die Venus-Fluoreszenz bei 535 nm detektierbar.

Radius (Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die strahlungsfreie Energieübertragung halbmaximal ist) von 4,4 nm (Dacres u. a. 2010). Der Energietransfer ist hierbei mit der sechsten Potenz invers proportional zur Distanz. Diese große Abhängigkeit von räumlicher Nähe lässt sich für die Anwendung in der Untersuchung von PPI nutzen, indem die potenziellen Interaktionspartner jeweils an ein Akzeptor- oder Donorprotein gekoppelt werden. Die Anwendung von BRET zur PPI-Untersuchung wurde erstmals 1999 beschrieben (Y. Xu u. a. 1999). Die beiden Fluorophore werden so gewählt, dass das Emissionsmaximum des Donor-Fluorophors möglichst stark mit dem Exzitationsspektrum des Akzeptor-Fluorophors übereinstimmt. Mit verschiedenen Varianten der Donor- und Akzeptor-Fluorophore sind unterschiedliche BRET-Techniken möglich: *BRET*<sup>1</sup>, *BRET*<sup>2</sup>, enhanced BRET (eBRET) und *BRET*<sup>3</sup>. *BRET*<sup>2</sup> beispielsweise beruht auf der Verwendung des DeepBlueC-Substrats (Emissionsmaximum der Rluc dadurch bei 400 nm) und GFP (Emissionsmaximum 511 nm), wodurch eine bessere Trennung der Emissionsspektren erreicht wird (Ayoub u. a. 2010). *BRET*<sup>3</sup> beruht auf der Verwendung eines veränderten rot fluoreszierenden Proteins (mOrange, Emissionsmaximum 564 nm) (De u. a. 2009). In dieser Arbeit wurde die *BRET*<sup>1</sup>-Variante verwendet, im Folgenden nur BRET genannt, unter der Verwendung der Coelenterazin-Variante *ViviRen*<sup>TM</sup>. *ViviRen*<sup>TM</sup> wird erst intrazellulär durch zelleigene Esterasen der Luciferase zugänglich gemacht (Kimura u. a. 2010) und ermöglicht so die Beschränkung der BRET-Signale auf lebende Zellen. Zudem bietet *BRET*<sup>1</sup> unter der Verwendung von *ViviRen*<sup>TM</sup> die höchste

Fluoreszenzquantenausbeute. Als Donorprotein wurde die humanisierte Variante dieser Renilla Luciferase (hRluc) verwendet, als Akzeptor eine Variante (Venus) (Nagai u. a. 2002, Hamdan u. a. 2005) des YFP. Die zu untersuchenden Proteine müssen hierzu zunächst genetisch in cDNA-Fusionskonstrukten mit den Donor- bzw. Akzeptorproteinen verbunden werden. Aus der sehr geringen Distanz von nur 10 nm, die Akzeptor- und Donorprotein maximal voneinander entfernt sein dürfen, und der Abhängigkeit des BRET von der Dipol-Dipol-Orientierung ergibt sich, dass eine Interaktion als falsch negativ eingeschätzt werden kann, wenn Akzeptor- und Donorprotein ungünstig ausgerichtet sind, obwohl die gekoppelten Interaktionspartner tatsächlich interagieren. Durch die Testung in Interaktionsexperimenten mit mehreren Kombinationen an Akzeptor- bzw. Donorkonstrukten kann dieses Risiko vermindert werden. Hierzu werden zu jedem zu untersuchenden Protein 4 rekombinante cDNA-Konstrukte erschaffen, die jeweils hRluc oder Venus am C-Terminus oder am N-Terminus tragen. Aus der Kombination der 4 Varianten beider Interaktionspartner ergeben sich dann insgesamt 8 Kombinationen. Eine Interaktion wird als gegeben angesehen, wenn mindestens eine der Kombinationen eine BRET-Ratio über dem methodenspezifischen Grenzwert zeigt. Durch dieses Vorgehen kann die Sensitivität des Verfahrens deutlich erhöht werden (Pfleger u. a. 2006a, Schatz 2014). Aus der Abhängigkeit des BRET-Signals vom Akzeptor-Donor-Abstand und der Abhängigkeit dieses Abstandes von Konformationszustand und räumlicher Orientierung von C- und N-Terminus ergibt sich, dass in solchen Experimenten keine Aussagen über die Stärke, Stabilität und Dauer der PPI getroffen werden können. Außer diesen Experimenten mit einem festen Akzeptor-/Donor-Verhältnis (3:1), die nur eine dichotome Aussage hinsichtlich der Frage treffen können, ob eine PPI vorliegt, gibt es noch die Möglichkeit, qualitative Aussagen über PPI mittels BRET zu treffen. Hierzu müssen die Akzeptor-/Donor-Verhältnisse systematisch variiert werden, um über Dissoziationskonstanten die Kinetik der Interaktion zu erfassen. Die Variation der Akzeptor-/Donor-Verhältnisse wird für Sättigungs- und Konkurrenzexperimente verwendet. Über Sättigungsexperimente lassen sich relative Bindungsaffinitäten für PPI bestimmen, das Maß hierfür ist das Akzeptor/Donor-Verhältnis der halbmaximalen BRET-Ratio als Maß der relativen Bindungsaffinität ( $BRET_{50}$ ), die das Akzeptor/Donor-Verhältnis angibt, bei dem 50 % des maximalen BRET-Signals erreicht wird. Weiterhin lässt sich über Sättigungsexperimente die Spezifität einer PPI beurteilen (siehe Abbildung 2.6). Hierzu wird das BRET-Signal für mehrere unterschiedliche Akzeptor-/Donor-Verhältnisse (z. B. 3:1, 1:1, 1:3, 1:6, 1:9, 1:12, 1:18) bestimmt. Für spezifische Interaktionen kann man eine Sättigung des BRET-Signals bei höheren Akzeptor-Donor-Verhältnissen mit dem Erreichen eines stabilen Plateaus erwarten, während nicht-spezifische Interaktionen zwischen Proteinen aufgrund von zufälligen Kollisionen und zufälliger räumlicher Nähe zu einem linearen Anstieg des BRET-Signals führen (Pfleger u. a. 2006b). Unter Zugabe von Substanzen wie beispielsweise Rezeptorliganden lässt sich auch deren Einfluss auf die PPI-Kinetik sowie auf Konformationsänderungen untersuchen. In dieser Arbeit wurde zur Detektion der Biolumineszenz und Fluoreszenz ein Luminometer verwendet. Eine mikroskopische Darstellung einzelner Zellen zur Charakterisierung der subzellulären Verteilung des BRET-Signals ist aufgrund des schwachen Biolumineszenzsignals

schwer zu erreichen und mit Luminometern nicht möglich, mittlerweile unter Verwendung von CCD-Kameras jedoch realisierbar (X. Xu u. a. 2007). Die verwendete Methode ermöglicht zusammenfassend die Untersuchung von PPI in lebenden eukaryotischen Zellen und somit von posttranslational modifizierten Proteinen in ihrem tatsächlichen subzellulären Kompartiment in Echtzeit. Sie eignet sich damit im Besonderen für die Untersuchung von Membranproteinen (Ayoub 2002). BRET wurde zudem während der Dissertation in der *Arbeitsgruppe Molekulare Pädiatrie* weiterentwickelt zu *informatics aided BRET* (iBRET) durch die Etablierung auf einem Robotersystem mit deutlich höherem Durchsatz und größerer Genauigkeit.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansatzpunkte gewählt, um sich über die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionspartner von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 in einem BRET-System einer funktionellen Charakterisierung der Proteinfamilie zu nähern und einen Beitrag zur Entschlüsselung der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen der komplexen Erkrankung Asthma zu leisten.

Im ersten Teil der Arbeit sollten über die Erstellung eines Interaktoms untersucht werden, welche zellulären Funktionen ORMDL ausübt. Aufgrund der starken evolutionären Konservierung der ORMDL-Proteinfamilie wird zunächst die Übertragung von bekannten Interaktionspartnern aus der Hefe, einschließlich der Homo- und Heterooligomerisierungen innerhalb der ORM-Proteinfamilie, auf den Menschen unternommen. Weitere mögliche Interaktionspartner ergeben sich aus der Lokalisation von ORMDL in der Membran des ER, den potenziellen Funktionen in der UPR und der Sphingolipidsynthese und den Pathomechanismen der Asthmagenese, während eine zufällige Auswahl von Interaktionspartnern zur Validierung dient. Für die Erstellung des ORMDL-Interaktoms werden die geeigneten Methoden der BRET und der Co-IP verwendet.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Interaktionen aus diesem ORMDL-Interaktom genauer charakterisiert. Anhand der Interaktion der ORMDL-Proteine mit dem asthmarelevanten  $\beta_2$ -AR wird, wiederum mittels BRET und Co-IP, sowohl der Einfluss des Allelstatus von  $\beta_2$ -AR als auch von  $\beta$ -Sympathomimetika untersucht. Die hieraus abgeleitete Fragestellung, ob ORMDL einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR ausüben könnte, wird schließlich mittels InCell/OnCell-ELISA geprüft.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung der Funktion der ORMDL-Proteine zu leisten. Darüber hinaus sollten mögliche Mechanismen identifiziert werden, die der Assoziation von Polymorphismen in *ORDML*-Genen mit dem Auftreten von Asthma bronchiale im Kindesalter zugrunde liegen.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2.1

Produkt	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
AMAXA <sup>®</sup> Elektroporationssystem	Lonza, Köln, Deutschland
Nucleofector <sup>®</sup> II	
AMAXA <sup>®</sup> Elektroporationssystem	Lonza, Köln, Deutschland
96-well Shuttle	
Arbeitsbank Uniflow KR-130 Biohazard	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Brutschrank	Thermo Scientific <sup>™</sup> , Wilmington, USA
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
DIANA III Bildgebungssystem	Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt, Deutschland
Digital Sonifier <sup>®</sup>	Branson, Ferguson, USA
Easypet <sup>®</sup> Pipettierhilfe 0,1-100 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einkanalpipetten Research <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eluator <sup>®</sup> Vacuum Elution Device	Promega, Madison, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FluoStar <sup>™</sup> Optima Microplate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gel Jet Imager Multi-Dark Box	Intas, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresekammer XCell	
Surelock	life technologies <sup>™</sup> , Carlsbad, USA
Heizblock	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Inkubator C200	Labotect, Göttingen, Deutschland
Karussell LPT220 EVO	LiCONiC, Mauren, Lichtenstein

Produkt	Hersteller
Luminometer LUMIstar® Filter 475 ± 30 nm	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Luminometer LUMIstar® Filter 535 ± 30 nm	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Luminometer LUMIstar® OPTIMA 96-well Mikroplatten	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
MasterCycler® Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Multipipette Dispenser 1-2000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnology, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zellzählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipette 8-Kanal 20-200 µl	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipette Eppendorf variabel 0,1-2,5 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipette Eppendorf variabel 2,0-20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipette Eppendorf variabel 20-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipette Eppendorf variabel 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipette Pipetman® variabel 0,2-2 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette Pipetman® variabel 200-1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettierarbeitsplattform Freedom EVO™200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Pipettierhilfe Easypet® für 0,1 bis 100 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler MixMate®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttelinkubator Excella® E24R	New Brunswick Scientific, Enfield, USA
Serologische Pipette wattiert 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette wattiert 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 50 ml	Corning®, New York, USA
Spannungsgeber PS1006	Apelex, Massy, Frankreich
Spectrophotometer Ultrospec® 3100 Pro	Biochrom, Darmstadt, Deutschland
Temperaturregler, PTC-100 programmierbar	MJ Research, St. Bruno, Kanada
ThermoMixer®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	VWR, Darmstadt, Deutschland
Vakuumpumpe	KNF Lab, Freiburg, Deutschland
Vakuumpumpe Vac-Man® Laboratory	Promega, Madison, USA
Vakuumpumpe Welch	Promega, Madison, USA
Vortex-Genie® 2	Bender & Hobein, Bruchsal, Deutschland
Wasserbad	GFL, Großburgwedel, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Deutschland

Produkt	Hersteller
Wasserbad Julabo U3	Liebl & Ritzinger, München, Deutschland
Werkbank HERAsafe™	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter, Pasadena, USA
Zentrifuge Rotixa/KS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 16R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

### 2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.2

Produkt	Hersteller
Agarose Agar-Agar	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammonium Eisen(II)-sulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Amphotericin B 0,25 µg/ml	PAA, Pasching, Österreich
Ampicillin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Antibiotikum-Antimykotikum Lösung 1%	PAA, Pasching, Österreich
Antioxidant NuPAGE®	life technologies™, Carlsbad, USA
Aqua bidestillata	Hausapotheke, München, Deutschland
Borsäure H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumnitrat Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Centrifugal filter Units Amicon®Ultra	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Centrifuge Tube 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coelenterazin (CTZ) C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	P.J.K., Kleinblittersdorf, Deutschland
Complete-Mini EDTA-free	Roche, Basel, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Costar® Assay Plate 96-well, klar, flacher Boden mit Deckel	Corning®, New York, USA
Costar® Assay Plate 96-well, weiß, flacher Boden mit Deckel	Corning®, New York, USA
Cryo Tubes	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
D(+)-Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Deep-Well-Plate, 96-well, runder Boden	Corning®, New York, USA

Produkt	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat $Na_2HPO_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Disposable Trough 25 ml	Tecan, Männedorf, Schweiz
Disposable Trough 100 ml	Tecan, Männedorf, Schweiz
Disposable Trough 96 Well	Corning®, New York, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) $C_2H_6OS$	PAA, Pasching, Österreich
DreamFect™Gold	OZ Biosciences, San Diego, USA
Drigalski-Spatel	VWR, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose mit Phenolrot	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose ohne Phenolrot	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), ohne Calcium und Magnesium	PAA, Pasching, Österreich
1 Kb plus DNA Ladder	life technologies™, Carlsbad, USA
Einmalspritzen BD Discardit™II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Ethanol 95%	Hausapotheke, München, Deutschland
Ethanol 100%	Hausapotheke, München, Deutschland
Ethidiumbromid $C_{21}H_{20}BrN_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) $C_{10}H_{16}N_2O_8$	PAA, Pasching, Österreich
Ethylendioxybisethylennitrilotetraessigsäure (EGTA) $C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	PAA, Pasching, Österreich
Expand High Fidelity™PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
FastDigest™Buffer (10x)	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
FastDigest™Green Buffer (10x)	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
Fetales Bovines Kälberserum (FBS)	life technologies™, Carlsbad, USA
Filtropurs 0,45 µm, Spritzenvorsatzfilter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Formaldehyd $CH_2O$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gateway®BP-Clonase™II Enzyme-Mix	life technologies™, Carlsbad, USA
Gateway®LR-Clonase™II Enzyme-Mix	life technologies™, Carlsbad, USA
Gelkammer Ladepuffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gel Loading Solution (6x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gewebekulturflasche 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Glutathion	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin $C_3H_8O_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hefeextrakt	Oxoid, Hampshire, Vereinigtes Königreich
HEPES (99,5%) $C_8H_{18}N_2O_4S$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydrogenchlorid $HCl$	Hausapotheke, München, Deutschland



Produkt	Hersteller
Hygromycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
HYPERFlask® Zellkulturflasche	Corning®, New York, USA
Impfschlinge 1 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
In-Cell ELISA Colorimetric Detection Kit	Thermo Scientific™, Rockford, USA
Kaliumchlorid <i>KCl</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat <i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
KAPA HiFi Hot Start PCR Kit	Peqlab, Erlangen, Deutschland
KAPA HiFi DNA-abhängige DNA-Polymerase	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Katalase aus boviner Leber, 2,000-5,000 Einheiten/mg Protein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LDS Sample Buffer (4x) NuPAGE®	life technologies™, Carlsbad, USA
Liquid Handling Disposable Tips 50 µl, steril mit Filter	Tecan, Männedorf, Schweiz
Liquid Handling Disposable 200 µl, steril mit Filter	Tecan, Männedorf, Schweiz
Liquid Handling Disposable Tips 1000 µl, steril mit Filter	Tecan, Männedorf, Schweiz
Lithium Dodecyl Sulfat (LDS) Puffer	life technologies™, Carlsbad, USA
Magnesiumsulfat <i>MgSO<sub>4</sub></i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
MCA96 Disposable Tips 100 µl, steril mit Filter	Tecan, Männedorf, Schweiz
Methanol <i>CH<sub>3</sub>OH</i>	Hausapotheke, München, Deutschland
Microtest Plate 96-well, flacher Boden	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Microtube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
µMac Beads	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
µMac-Säulen	Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
NativePAGE® Bis-Tris-Gel 4-16% 10-well	life technologies™, Carlsbad, USA
NativePAGE® Cathode Buffer (20x)	life technologies™, Carlsbad, USA
NativePAGE® Running Buffer (20x)	life technologies™, Carlsbad, USA
NativePAGE® SDS Sample Buffer (4x)	life technologies™, Carlsbad, USA
Natriumacetat <i>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub></i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid <i>NaCl</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat <i>NaHCO<sub>3</sub></i>	Fluka, St. Louis, USA
Natriumhydroxid <i>NaOH</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nitrozellulosemembran BA-S 85	Schleicher & Schüll BioScience, Dassel, Deutschland

Produkt	Hersteller
Nonident P-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nukleotransfektionsplatte 96- <i>well</i>	Lonza, Cologne, Deutschland
NuPAGE® Bis-Tris Midi Gel 20- <i>well</i> 4-12%	life technologies™, Carlsbad, USA
NuPAGE® Bis-Tris Midi Gel 20- <i>well</i> 10%	life technologies™, Carlsbad, USA
NuPAGE® Bis-Tris SDS-PAGE 4-12% Gel System	life technologies™, Carlsbad, USA
NuPAGE® SDS Sample Buffer (4x)	life technologies™, Carlsbad, USA
NuPAGE® MOPS LDS Running Buffer (20x)	life technologies™, Carlsbad, USA
Optiplate™96F black, 96- <i>well</i> , schwarz, flacher Boden	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Pasteurpipette, Glas ca. 23 mm	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Tube 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Penicillin 100 U/ml	PAA, Pasching, Österreich
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Petrischale, Ø 90 mm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, St.Leon-Rot, Deutschland
Pipettenspitze ep Dualfilter T.I.P.S.®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze Typ A 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze Typ B 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze Typ D 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze Typ E lang 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pluronic® F-68	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>2</sub> S	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteaseinhibitoren	life technologies™, Carlsbad, USA
Proteinase K	life technologies™, Carlsbad, USA
Pure Yield™Plasmid Maxi-prep System	Promega, Madison, USA
QuickChange™Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, München, Deutschland
Reaktionsgefäß 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml easy cap	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2 ml, graduert mit Druckverschluss, DNase/RNase-frei	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Rinderalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin und Phenolrot	PAA, Pasching, Österreich

Produkt	Hersteller
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin ohne Phenolrot	PAA, Pasching, Österreich
Sample Reducing Agent (10x) NuPAGE®	life technologies™, Carlsbad, USA
Schüttelkolben 500 ml Glas	Schott Duvan, Mainz, Deutschland
Schüttelkolben 1 l Glas	Schott Duvan, Mainz, Deutschland
Serologische Pipetten (2 ml /5 ml /10 ml /25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Square PET Storage Bottle 500 ml	Corning®, New York, USA
Sterilbecher 1 l	Omnilab, Bremen, Deutschland
Streptomycin 0,1 mg/ml	PAA, Pasching, Österreich
Sucrose Trypsin ohne Phenolrot	Apotheke Innenstadt, München, Deutschland
SuperSignal West Femto Substrate	Thermo Scientific™, Rockford, USA
T4-Ligase DNA-Ligase	Roche Applied Sciences, Penzberg, Deutschland
TBE-Puffer (10x)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tissue Culture Flask, 75 und 25 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) HCl NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIS Gepufferte Salzlösung mit Tween® (TBS-Tween)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton® X100 reduziert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin (0,125%)	PAA, Pasching, Österreich
Trypton	Oxoid, Hampshire, Vereinigtes Königreich
Tube (15 ml / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
ViviRen™	Promega, Madison, USA
Wasserstoffperoxid H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hausapotheke LMU, München, Deutschland
Zentrifugenbecher	Nalgene, Rochester, USA
Zentrifugenröhrchen	Nalgene, Rochester, USA
Zentrifugentube 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugentube 50 ml	Corning®, New York, USA

### 2.1.3 Lösungen, Reagenzien-Kits und Puffer

Tabelle 2.3

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung
AMAXA® Puffer	0,0992 g/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,3996 g/L $\text{KCl}$ , 0,1011 g/L $\text{MgSO}_4$ , 6,02 g/L $\text{NaCl}$ , 2 g/L $\text{NaHCO}_3$ , 1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 g/L (D+)-Glukose, 5,2 g/L HEPES, in 500 ml $\text{dH}_2\text{O}$ gelöst, mit 1 M $\text{HCl}$ auf pH 7,3 eingestellt, 0,001 g/L Glutathion, in 200 $\mu\text{l}$ der vorbereiteten Lösung aufgelöst, zurück zur Ausgangslösung gegeben, Volumen auf 1 L mit $\text{dH}_2\text{O}$ ergänzt, 30 min mit Stickstoff begast, anschließend steril gefiltert (0,2 $\mu\text{m}$ )
Coelenterazin (CTZ) Puffer	64,28 g/L $\text{NaCl}$ , 0,82 g/L $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 29,92 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,44 g/L BSA, in $\text{dH}_2\text{O}$ gelöst und steril filtriert (0,2 $\mu\text{m}$ )
CTZ Stammlösung 1mg/ml	10 mg Coelenterazin, in 10 ml Methanol gelöst und aliquotiert
CoIP-Low-Salt-Puffer	20 mM TRIS $\text{HCl}$ pH 7,5
CoIP-Lysepuffer	50 mM TRIS $\text{HCl}$ pH 7,75, 150 mM $\text{NaCl}$ , 1% Nonident P-40, 1% Proteaseinhibitoren und 2 mM PMSF (Joe u. a. 2009)
CoIP Puffer A	10 mM Hepes-KOH pH 7,4, 10 mM $\text{KCl}$ , 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ , 5mM $\text{Na-EDTA}$ , 5 mM $\text{Na-EGTA}$ und 250 mM Sucrose
$\text{HCl}$ -Lösung 1 M	36,46 g $\text{HCl}$ in 1 L $\text{dH}_2\text{O}$ gelöst
HEPES-Puffer	22,35 mM HEPES Natriumsalz, auf pH 7,3 eingestellt
In-Cell ELISA Colorimetric	Bestandteile für 4 96-well Platten: Blocking Buffer 50 ml, Tris Buffered Saline (20x) 50 ml, Surfact-Amps® 20 (10% Tween®-20 Detergent) 10 ml, Surfact-Amps X-100 (10% Triton® X-100 Detergent) 10 ml, HRP Conjugate 0,15 ml, TMB Substrate 58 ml, TMB Stop Solution 55 ml, Janus Green Whole-Cell Stain 50 ml, Elution Buffer 2 x 30 ml, Thin Plate Seal Assembly 8 each. Alle Bestandteile werden bei 4 °C aufbewahrt
Milch 5%	1x TBS-Puffer (s.u.), 5% Milchpulver (w/v)
MOPS-Puffer 5% (v/v)	MOPS SDS running buffer NuPAGE® (20x)
$\text{NaCl}$ -Lösung 1 M	58,44 g $\text{NaCl}$ in 1 L $\text{dH}_2\text{O}$ gelöst
$\text{NaCl}$ -Lösung 5 M	292,2 g $\text{NaCl}$ in 1 L $\text{dH}_2\text{O}$ gelöst

Lösung bzw. Puffer	Zusammensetzung
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Bestandteile für 200 Aufreinigungen: 60 ml Lösung I (Lagerung: 4 °C), 60 ml Lösung II (Lagerung: 25 °C), 80 ml Lösung III (Lagerung: 25 °C), 110 ml PW Plasmid Buffer (Lagerung: 25 °C), 3 x 40 ml DNA Wash Buffer (Konz.) (Lagerung: 25 °C), 200 µl RNase A (Lagerung: 4 °C), 60 ml Elution Buffer (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) (Lagerung: 25 °C), 200 PerfectBind DNA Columns (Lagerung: 25 °C) und 200 2,0 ml Collection Tubes (Lagerung: 25 °C). Vor der Verwendung müssen die Lösung I mit 200 µl RNase komplettiert und zum Puffer DNA Wash 60 ml 100% Ethanol zugegeben werden.
Pluronic® F-68-Lösung 100 mg/ml	400 mg Pluronic® F-68 in 4 ml dH <sub>2</sub> O gelöst und steril filtriert (0,2 µm)
PureYield™ Plasmid Maxiprep	Bestandteile für 25 Aufreinigungen: 315 ml Cell Resuspension Solution (CRA) (Lagerung: 25 °C), 315 ml Cell Lysis Solution (CLA) (Lagerung: 25 °C), 315 ml Neutralization Solution (NSB) (Lagerung: 25 °C), 85,3 ml Endotoxin Removal Wash (Lagerung: 25 °C), 210 ml Column Wash (Lagerung: 25 °C), 50 ml Nuclease-Free Water (Lagerung: 25 °C), 25 PureYield™ Clearing Columns (Lagerung: 25 °C), 25 PureYield™ Maxi Binding Columns (Lagerung: 25 °C). Vor Verwendung werden zum Puffer <i>Endotoxin Removal Wash</i> zur Entfernung von Endotoxinen 57 ml Isopropanol und zum Puffer <i>Column Wash</i> 350 ml 95% Ethanol hinzugefügt.
Quenching Lösung	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 1xTBS
Renilla Luciferase Testpufferlösung	NaCl 64.28 g/L, Na <sub>2</sub> -EDTA 0.82 g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 29.92 g/L, BSA 0.44 g/L, steril gefiltert und aufbewahrt bei 4 °C
TBE-Puffer	89 mM TRIS-HCl, 89 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 2mM EDTA (0,5%), pH zwischen 8,1-8,5 eingestellt
TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0
1xTBS Puffer	0,05% Tween® mit 10% (v/v) 10x TBS-Puffer, 0,05% (v/v) TBS-Tween
10xTBS-Puffer 6,05%	TRIS, 8,76% (m/v) NaCl
Trypsin-EDTA-Verdünnung	Trypsin-EDTA 1:10 in PBS (100ml) + 150 µg/ml Pluronic® F-68

### 2.1.4 Medium

Tabelle 2.4

Medium	Zusammensetzung
Lysogeny Broth (LB) Medium	10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, mit 5 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert (20 min, 121 °C)
LB-Agarfestmediumplatten 2%	15 g/L Agar, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, mit 5 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert (20 min, 121 °C) und nach Bedarf Antibiotikum zugegeben, in Petrischalen verteilt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose mit Phenolrot	mit 10% FBS, 1% Antibiotikum-Antimykotikum Lösung, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose ohne Phenolrot	mit 10% FBS, 1% Antibiotikum-Antimykotikum Lösung, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640 Medium)	mit L-Glutamin und Phenolrot mit 10% FBS, 1% Antibiotikum-Antimykotikum Lösung, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640 Medium)	mit L-Glutamin und ohne Phenolrot mit 10% FBS, 1% Antibiotikum-Antimykotikum Lösung, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B

### 2.1.5 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 2.5

Zelllinie/Bakterienstamm	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ , chemisch kompetent	life technologies™, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue, chemisch kompetent	Stratagene, München, Deutschland
Fibroblasten-Nierenzelllinie der grünen Meerkatze (COS-7) ACC 60	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293) ACC 305	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Zelllinie/Bakterienstamm	Hersteller
Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293-Flp-In <sup>TM</sup> -293)	life technologies <sup>TM</sup> , Carlsbad, USA

### 2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.6

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
β2-AR (H-20) sc-569	—	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Kaninchen Anti-Ziegen IgG, polyklonal, Peroxidase-konjugiert (HRP)	—	Abcam, Cambridge, UK
Murin Anti-hRluc IgG, monoklonal	1:10000	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Murin Anti-Phenylalanine-Hydroxylase, monoklonal	—	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Murin Anti-V5 IgG	1:5000	life technologies <sup>TM</sup> , Carlsbad, USA
Ratten Anti-Hämagglutinin (HA)	1:48	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
Ziege Anti-Human IgG F(ab') <sub>2</sub> -Fragment-Spezifisch, Peroxidase-konjugiert (HRP)	—	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege Anti-Murin IgG-HRP Antikörper	1:10000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Ziege Anti-ProteinA, polyklonal	1:2000 - 1:10000	Abcam, Cambridge, UK

### 2.1.7 β-Sympathomimetika

Für die BRET-Experimente unter dem Einfluss von β-Sympathomimetika wurden folgende Substanzen verwendet.

Tabelle 2.7

β-Sympathomimetika	Stammlösung	Hersteller
Salbutamol	400 μM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salmeterol Xinafoate	660 μM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formoterol	400 μM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Clenbuterol	400 μM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isoproterenol Hydrochlorid	400 μM	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.8 Restriktionsenzyme

Tabelle 2.8

Restriktionsenzym	Puffer	Schnittstelle	Hersteller
<i>DpnI</i>	1x	Gm6A/TC	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
FastDigest™	FastDigest™ Buffer		
<i>EcoRI</i>	1x Buffer <i>EcoRI</i>	G/AATTC	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
<i>FBgIII</i>	1x Buffer O	A/GATCT	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
<i>NotI</i>	1x Buffer O	GCATG/C	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
<i>SalI</i>	1x Buffer O	G/TCGAC	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
<i>XhoI</i>	1x	C/TCGAG	Thermo Scientific™, Wilmington, USA
FastDigest™	FastDigest™ Buffer		

### 2.1.9 Vektoren und DNA

#### Vektoren

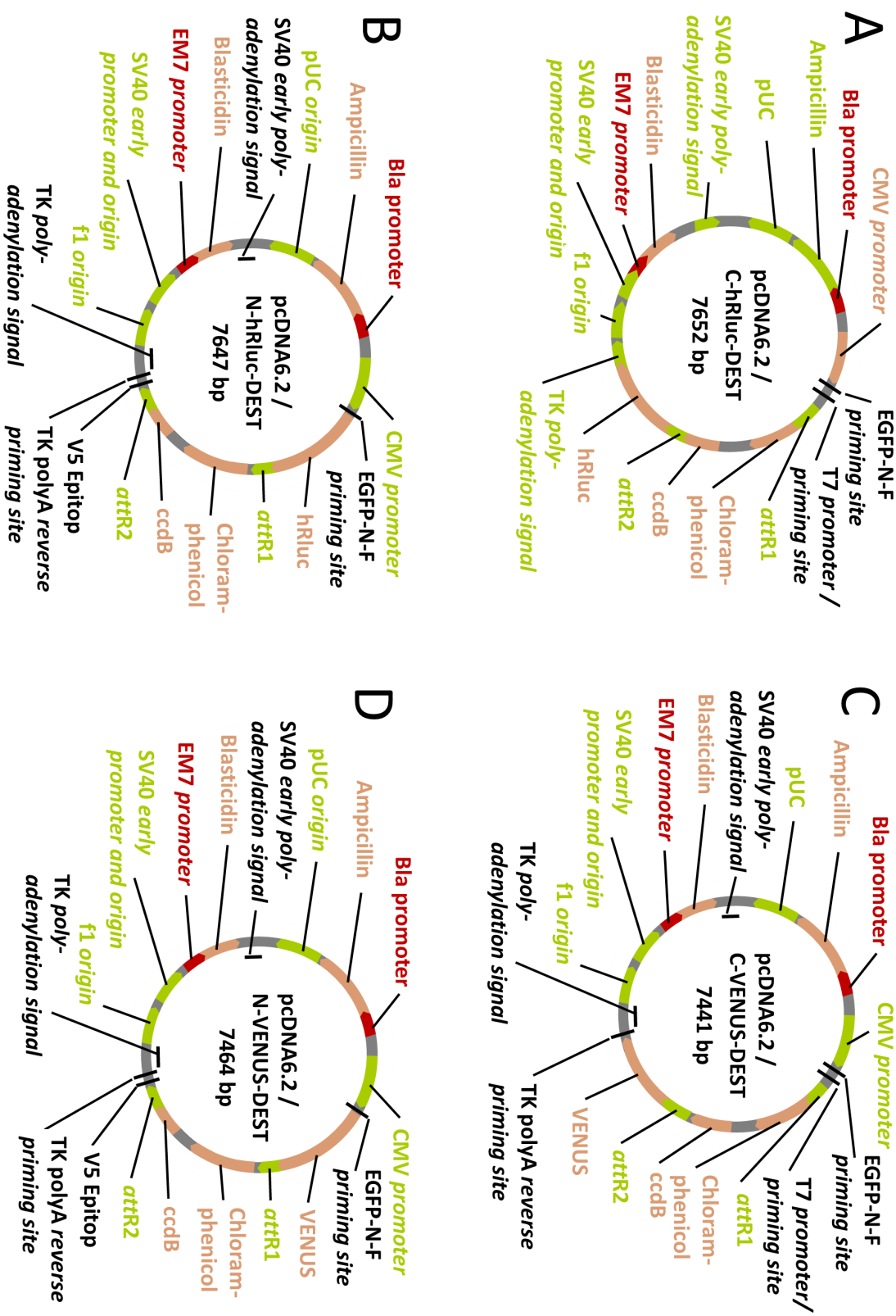
Die für die Untersuchung der PPI nötigen cDNAs lagen jeweils in 4 verschiedenen pDEST-Vektoren vor. Jede cDNA war in den Varianten 5'-hRluc-cDNA-3' (Vektor: pDEST-N-hRluc), 5'-Venus-cDNA-3' (Vektor: pDEST-N-Venus), 3'-hRluc-cDNA-5' (Vektor: pDEST-C-hRluc) und 3'-Venus-cDNA-5' (Vektor: pDEST-C-Venus) vorhanden. In eukaryoten Zellen werden dadurch Proteinkonstrukte exprimiert mit N- bzw. C-terminalem Donor- bzw. Akzeptor-Tag in jeweils 4 Varianten pro Protein. In dieser Arbeit wurden eine humanisierte Renilla Luciferase (hRluc) und das stabilisierte gelb-fluoreszierendes Protein (YFP)-Derivat Venus (Nagai u. a. 2002, Hamdan u. a. 2005) verwendet. Venus ist gegenüber dem YFP an den 7 Positionen V68L, R79K, F46L, F64L, M153T, V163A und S175G durch einen Aminosäureaustausch verändert und dadurch deutlich stabiler bei gleichzeitig besserer Quantenausbeute.

Tabelle 2.9

Vektor	Tag	Resistenzen	Hersteller
pCD001	Protein A	Ampicillin Hygromycin	Zur Verfügung gestellt durch AG Systembiochemie Prof. Schliebs, Ruhruniversität Bochum, Deutschland



Vektor	Tag	Resistenzen	Hersteller
pCD003	Protein A	Ampicillin Hygromycin	Zur Verfügung gestellt durch AG Systembiochemie Prof. Schliebs, Ruhruniversität Bo- chum, Deutschland
pENTR223		Spectinomycin	life technologies™, Carlsbad, USA
pENTR221		Kanamycin	life technologies™, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2/HA- DEST51	N-HA	Ampicillin	life technologies™, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2/V5- DEST51	N-V5	Ampicillin	life technologies™, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2- DEST	N-Venus	Ampicillin	life technologies™, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2- DEST	C-Venus	Ampicillin	life technologies™, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2- DEST	N-hRluc	Ampicillin	life technologies™, Carlsbad, USA
pcDNA™6.2- DEST	C-hRluc	Ampicillin	life technologies™, Carlsbad, USA
pOG44	Flp-In™ Recombinase	keine Resistenz	life technologies™, Carlsbad, USA



**Abbildung 2.1:** Vektorkarten der BRET-Expressionsvektoren (A) C-hRluc-DEST (B) N-hRluc-DEST (C) C-Venus-DEST (D) N-Venus-DEST

Tabelle 2.10

Tag	Sequenz
hRluc	ATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCGAGCAACGCAAACGCATGATCACTGGG CCTCAGTGGTGGGCTCGCTGCAAGCAAATGAACGTGCTGGACTCCTTCATCA ACTACTATGATTCCGAGAAGCACGCCGAGAACGCCGTGATTTTTCTGCATGGT AACGCTGCCTCCAGCTACCTGTGGAGGCACGTGCTGCCTCACATCGAGCCCG TGGCTAGATGCATCATCCCTGATCTGATCGGAATGGGTAAAGTCCGGCAAGAG CGGGAATGGCTCATATCGCCTCCTGGATCACTACAAGTACCTCACCGCTTGGT TCGAGCTGCTGAACCTTCCAAAGAAAATCATCTTTGTGGGCCACGACTGGGG GGCTTGTCTGGCCTTTCACTACTCCTACGAGCACCAAGACAAGATCAAGGCC ATCGTCCATGCTGAGAGTGTCTGTGGACGTGATCGAGTCCTGGGACGAGTGGC CTGACATCGAGGAGGATATCGCCCTGATCAAGAGCGAAGAGGGCGAGAAAA TGGTGCTTGAGAATAACTTCTTCGTCGAGACCATGCTCCCAAGCAAGATCATG CGGAAACTGGAGCCTGAGGAGTTCGCTGCCTACCTGGAGCCATTCAAGGAGA AGGGCGAGGTTAGGACGGCCTACCCTCTCCTGGCCTCGCGAGATCCCTCTCG TTAAGGGAGGCAAGCCCGACGTCTGTCAGATTGTCCGCAACTACAACGCCTA CCTTCGGGCCAGCGACGATCTGCCTAAGATGTTTCATCGAGTCCGACCCTGGGT TCTTTTCCAACGCTATTGTGCGAGGGAGCTAAGAAGTTCCTAACACCGAGTTC GTGAAGGTGAAGGGCCTCCACTTCAGCCAGGAGGACGCTCCAGATGAAATG GGTAAGTACATCAAGAGCTTCGTGGAGCGCGTGCTGAAGAACGAGCAGTAA
Venus	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTC GAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTAATCTGCACCACCG GCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTAGGCTACGGCCT GCAGTGCTTCGCCCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAG TCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGG TGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC TGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACGG CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACA TCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTC CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGA GTTCTGTGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Ein BRET-Kontrollvektor lag im Labor bereits vor (Schatz 2014). Für dieses Venus-hRluc Fusionsprotein war die kodierende Sequenz für Venus ohne Stopcodon amplifiziert und in den C-terminal fusionierten hRluc-pDEST-Vektor eingefügt worden. Dieser Kontrollvektor dient als Positivkontrolle für das Experiment und wird auf jeder 96-*well*-Platte einmalig aufgetragen. Weiterhin lag im Labor bereits ein zweiter BRET-Kontrollvektor vor, der ausschließlich das Venus-Konstrukt enthält und als Korrekturfaktor dient für das Durchbluten des hRluc-Signals.

## DNA-Sequenzen

Über PlasmID bzw. MGC bestellt und in das Gateway® Cloning-System kloniert wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die cDNAs der folgenden Proteine: ADORA2B, ADORA3, APH1A, APH1B, APP, ATP2A2, BIP, CANX, CAXDR, CD132, CD28, CD40L, CD58, CHRM3, CSNK1G2, CYP51A1, DDOST, DNAJB9, EEF1A1, ERCC5, FOS, GnRH, GOSR2, GZMB, HSP90AB1, IL3RB, KDELR2, KDELR3, MAP2K2, MSMO1, NSDHL, PEX10, PEX12, PSEN1, PSEN2, PSENEN, SEC22B, SIL, SSR1, STAT1, STAT3, STAT4, STAT5B, STAT6, SUMO1, TMED1, TRAPPC2, UBL1 und XBP1. Die cDNAs erhielten wir in transformierten Vektoren. Diese wurden ausplattiert, gepickte Klone in LB-Medium kultiviert, die Plasmid-DNA wurde anschließend über Minipreps (Abschnitt 2.2.6) aufgereinigt und die cDNA-Sequenzen geprüft (MWG Eurofins). Dann konnten die *expression clones* erstellt werden (Abschnitt 2.2.3), sofern die cDNA bereits in pENTR-Vektoren gekauft worden war. Wenn dies nicht möglich war, wurde wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben verfahren, um zunächst die *entry clones* zu erstellen.

**Tabelle 2.11:** Übersicht über die verwendeten cDNAs, ihre Bezugsquelle, die Referenzsequenzen und die Vektoren, in denen die cDNA vorliegt. Zusätzlich lagen alle cDNAs auch in den Expressionsvektoren pEF-C-hRluc-DEST, pEF-N-hRluc-DEST, pEF-C-Venus-DEST und pEF-N-Venus-DEST vor.

Gen	Quelle	Accession Number	pENTR
ABCD1	MGC	BC015541	pENTR221
ABCD4	PlasmID	BC012815	pENTR221
ACAA1	PlasmID	BC011977	pENTR221
ACADM	MGC	BC005377	pENTR221
ACADS	PlasmID	BC025963	pENTR221
ACOT2	PlasmID	BC006335	pENTR221
ACSL4	MGC	BC034959	pENTR223
ACSL5	MGC	NM203379.1	pENTR223
ADORA2B	PlasmID	BC025722	pENTR223
ADORA3	MGC	BC029831	pENTR223
ADRB2	IMAGE	NM000684	pENTR221
ADRB2	IMAGE + SDM	NM000684, rs1042713	pENTR221
ADRB2	IMAGE + SDM	NM000684, rs1042714	pENTR221
ALDH3A2	PlasmID	BC002430	pENTR221
AMACR	PlasmID	BC009471	pENTR221
APH1A	PlasmID	BC017699.1	pENTR221
APH1B	PlasmID	AL136671	pENTR223
APP	PlasmID	NM201413.2	pENTR221
ATP2A2	MGC	BC035588	pENTR223
BAAT	PlasmID	BC009567	pENTR221

Gen	Quelle	Accession Number	pENTR
BCL10	Roth u. a. 2014	NM003921	pENTR221
BSG	MGC	BC009040	pENTR223
CALR	MGC	BC007911	pENTR221
CANX	PlasmID	NM001024649.1	pENTR221
CARD9	MGC	BC008877	pENTR221
CCL11	PlasmID	BC017850	pENTR221
CCR3	PlasmID	NM178329.1	pENTR221
CCR4	MGC	BC071751	pENTR223
CCR6	MGC	BC037960	pENTR223
CD2	IMAGE	BC033583	pENTR221
CD86	IMAGE	BC040261	pENTR221
CHRM3	PlasmID	NM000740.2	pENTR221
COPS5	MGC	BC001187	pENTR221
CSNK1G2	PlasmID	BC020972	pENTR221
CXADR	PlasmID	NM001338.4	pENTR221
CXCL1	PlasmID	BC011976	pENTR221
CXCL2	PlasmID	AY893465.1	pENTR221
CXCL3	PlasmID	BC016308	pENTR221
CXCR4	MGC	BC020968	pENTR223
CYP51A1	PlasmID	BC032322	pENTR221
CYSLTR1	PlasmID	NM006639.2	pENTR221
DDOST	PlasmID	BC002594	pENTR221
DDX3Y	MGC	BC034942	pENTR221
DDX5	MGC	BC016027	pENTR221
DIPA	MGC	BC008796	pENTR221
DNAJB11	MGC	BC001144	pENTR223
DNAJB9	PlasmID	BC028912	pENTR221
DNM1L	MGC	BC024590	pENTR223
EEF1A1	PlasmID	BC009733	pENTR221
EPHX2	PlasmID	BC007708	pENTR221
Fis1	MGC	BC003540	pENTR223
FKBP1A	PlasmID	BC005147	pENTR221
FOS	PlasmID	BC004490	pENTR221
Fyn	MGC	BC032496	pENTR223
GCDH	PlasmID	BC002579	pENTR221
GNPAT	IMAGE	BC000450.2	pENTR221
GOSR2	PlasmID	NM004287.3	pENTR221
GSTK1	MGC	BC063425	pENTR223
GZMB	PlasmID	NM004131.4	pENTR221
HACL1	MGC	CCDS2627.1	pENTR223
HADHA	PlasmID	BC009235	pENTR221
HLX	Invitrogen	DQ896761.2	pENTR221

Gen	Quelle	Accession Number	pENTR
HNRNPK	MGC	BC014980	pENTR223
HSP90AB1	PlasmID	BC004928	pENTR221
HSPA5	PlasmID	BC020235	pENTR221
HSPA9B	PlasmID	BC000478	pENTR221
HSPD1	PlasmID	BC003030	pENTR221
IL10RB	MGC	BC001903	pENTR221
IL12RB1	MGC	BC137404	pENTR223
IL17RA	PlasmID	NM014339.6	pENTR221
IL21R	MGC	BC004348	pENTR221
IL23R	MGC	BC040720	pENTR223
IL2RB	MGC	BC025691	pENTR223
IL2RG	MGC	BC014972	pENTR223
IL8	PlasmID	BC013615	pENTR221
IL8RA	MGC	BC028221	pENTR223
IL8RB	MGC	BC037961	pENTR223
IVD	PlasmID	BC017202	pENTR221
Jun	MGC	BC006175	pENTR223
KDEL2	PlasmID	NM006854.3	pENTR221
KDEL3	PlasmID	NM016657.1	pENTR221
KRT17	MGC	BC000159	pENTR223
LMAN2	MGC	BC017263	pENTR223
MFN2	PlasmID	BC017061	pENTR221
MIF	MGC	BC000447	pENTR221
MOSC2	PlasmID	BC011973	pENTR201
MPV17	MGC	BC001115	pENTR223
MPV17L2	MGC	BC005064	pENTR223
MRO	PlasmID	BC029860.1	pENTR221
MSMO1	PlasmID	BC010653	pENTR221
NCSTN	MGC	BC047621	pENTR223
NSDHL	PlasmID	BC000245	pENTR221
OPRD1	PlasmID	BC111838	pENTR223
ORMDL1	Toncheva u. a. 2015	NM001128150.1	pENTR221
ORMDL2	Toncheva u. a. 2015	NM014182.4	pENTR221
ORMDL3	Toncheva u. a. 2015	NM139280.1	pENTR221
PAR2	MGC	BC018130	pENTR223
PDIA3	MGC	BC014433	pENTR223
PEX1	MGC	BC035575	pENTR221
PEX10 <sub>1</sub>	PlasmID	BC000543.2	pENTR221
PEX10 <sub>2</sub>	Invitrogen	NM002617.3	pENTR221
PEX11A	MGC	BC009697	pENTR223
PEX11B	MGC	BC011963	pENTR223
PEX11G	MGC	BC008780	pENTR223

Gen	Quelle	Accession Number	pENTR
PEX12	MGC	BC031085	pENTR221
PEX13	MGC	BC067090	pENTR221
PEX14	MGC	BC006327	pENTR223
PEX19	MGC	BC000496	pENTR221
PEX26	Schatz 2014	NM001127649.1	pENTR221
PEX5	MGC	BC010621	pENTR223
PEX6	MGC	BC048331	pENTR221
PEX7	Invitrogen	BC031606.1	pENTR221
PGLYRP1	PlasmID	NM005091	pENTR221
PHYH	MGC	BC029512	pENTR223
PSEN1	PlasmID	BC011729.2	pENTR223
PSEN2	PlasmID	BC006365	pENTR223
PSENEN	PlasmID	BC009575	pENTR221
PTCH1	MGC	BC043542	pENTR223
PXMP3	MGC	BC005375	pENTR223
PXMP4	MGC	BC001147	pENTR223
RAD50	MGC	BC136436	pENTR221
RHOC	MGC	BC007245	pENTR223
RORC	MGC	BC031554	pENTR223
RPS19	MGC	BC000496	pENTR223
S100A8	Roth u. a. 2014	NM002964.4	pENTR221
SEC22B	PlasmID	NM004892.5	pENTR221
SEC61A1	PlasmID	NM013336.3	pENTR223
SENP3	MGC	BC080658	pENTR221
SERP1	PlasmID	AL136807	pENTR201
SIGMAR1	MGC	BC004899	pENTR223
SIL1	PlasmID	BC011568	pENTR221
SLC25a17	MGC	BC005957	pENTR223
SLU7	MGC	BC010634	pENTR221
SNX6	Roth u. a. 2014	NM021249.3	pENTR221
SPINK5	Roth u. a. 2014	NM001127699.1	pENTR221
SPTLC1	MGC	BC068537	pENTR223
SPTLC1	MGC	BC007085	pENTR223
SSR1	PlasmID	NM003144.3	pENTR221
STAT1	PlasmID	NM007315.3	pENTR221
STAT3	PlasmID	NM213662.1	pENTR222
STAT4	MGC	BC031212	pENTR223
STAT5B	PlasmID	NM012448.3	pENTR223
STAT6	MGC	BC075852	pENTR223
SUMO1	PlasmID	BC006462	pENTR221
TBX21	MGC	BC039739	pENTR221
TCL1A	Roth u. a. 2014	NM021966.2	pENTR221

Gen	Quelle	Accession Number	pENTR
TEAD2	PlasmID	BC007556	pENTR221
TRAPPC2	PlasmID	NM001011658.3	pENTR221
TRIM37	MGC	BC036012	pENTR223
TUBA3C	MGC	NM006001.1	pENTR221
TUBB3	MGC	NM006086.3	pENTR221
UBA1	MGC	BC013041	pENTR221
VDAC1	PlasmID	BC008482	pENTR221
VDR	MGC	BC060832	pENTR221
XBP1	PlasmID	BC000938	pENTR221
ZDHHC3	PlasmID	BC015467	pENTR221

### Primer-Sequenzen

**Tabelle 2.12:** Primersequenzen für die Sequenzanalyse von cDNA im pDEST-Vektor

Vektor	Primernamen	Primersequenz
N-Venus-DEST	N-hRluc seq for -105	5'-CAAAATGTCGTAACAACCTCCGC-3'
C-Venus-DEST	C-YFP fo	5'-CTCGTTCAGCTTTCTTGTACAAAGT-3'
C-Venus-DEST	TK polyA re	5'-CTTCCGTGTTTCAGTTAGC-3'
N-hRluc-DEST	N-hRluc seq fo -105 -105	5'-CAAAATGTCGTAACAACCTCCGC-3'
C-hRluc-DEST	C-hRluc seq fo -138	5'-CATAGTGACTGGATATGTTGTG-3'
C-hRluc-DEST	TK polyA re	5'-CTTCCGTGTTTCAGTTAGC-3'

**Tabelle 2.13:** Primersequenzen für die Sequenzanalyse von cDNA im pENTR-Vektor

Vektor	Primernamen	Primersequenz
pENTR223	M13u: (forward)	5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3'
pENTR223	M13r: (reverse)	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

**Tabelle 2.14:** Primersequenzen für die SDM der  $\beta$ 2AR

SNP	Primernamen	Primersequenz
ADRB2 rs1042713	P156fwd	5'-CCTTCTTGCTGGCACCCAATAGAAGCCATGCG-3'
ADRB2 rs1042713	P156rev	3'-CGCATGGCTTCTATTGGGTGCCAGCAAGAAGG-5'



SNP	Primername	Primersequenz
ADRB2 rs1042714	P157fwd	5'-CCACGACGTCACGCAGGAAAGGGACGAGG-3'
ADRB2 rs1042714	P157rev	3'-CCTCGTCCCTTTCCTGCGTGACGTCGTGGG-5'

### 2.1.10 Software

**Tabelle 2.15:** Verwendete Softwareprogramme und Datenbanken

Produkt	Hersteller
Aida Image Analyzer Software v.4.04	Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt, Deutschland
BIND	<a href="http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp">http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp</a> , La Jolla, USA
BIOGRID	<a href="http://thebiogrid.org/">http://thebiogrid.org/</a> , Montreal, Kanada
Cytoscape	The Cytoscape Consortium, San Diego, USA
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a> , Cambridge, UK
Excel 2010	Microsoft Excel, Seattle, USA
I-TASSER	<a href="http://www.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/">http://www.zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/</a>
Image J	<a href="http://imagej.nih.gov">Imagej.nih.gov</a> , Bethesda, USA
MIPS	<a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/ppi/">http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/ppi/</a> , München, Deutschland
Oligonucleotide Properties Calculator	NWU, Chicago, USA
Prism Version 5.01	GraphPad Software, La Jolla, USA
QuikChange® Primer Design Programm	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Sequence Navigator	Applied Biosystems, Waltham, USA
STRING	SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Schweiz
UniProt	UniProt Consortium, Cambridge, UK
Vector NTI	life technologies™, Carlsbad, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA *in vitro* unter Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase (Mullis u. a. 1986). Durch die zyklische Durchführung, in der die Produkte eines Zyklus die Basis für den nächsten Zyklus bilden, kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation. Das *Expand High Fidelity PCR System* wurde für die Erstellung von DNA-Fragmenten bis 5 kb und die *Phusion<sup>TM</sup>High-Fidelity DNA Polymerase* für Produkte von 5-20 kb verwendet. Im *Expand High Fidelity PCR System* wurden 2,5 Einheiten DNA-Polymerase, 100 ng Template und je 15 pmol Primer verwendet. Die Primer wurden mit Onlineprogramm *Oligonucleotide Properties Calculator* erstellt und durch die Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Initial erfolgte eine DNA-Denaturierung bei 96 °C über 2 min. Dann folgten 10 PCR-Zyklen aus je 15 s Denaturierung bei 96 °C, 30 s Annealing bei 45 bis 68 °C (je nach Primerstruktur und -länge) und 1 bis 8 min Elongation (je nach Produktlänge: < 3 kb bei 68 °C, > 3 kb bei 72 °C). Diese Schritte wurden 20 Mal wiederholt. Zur Steigerung der Produktmenge wurde der Elongationsschritt pro Zyklus um 20 s verlängert. Schließlich erfolgte eine letzte Elongation bei 72 °C für 7 min zur Vervollständigung der in den vorausgehenden Zyklen nicht komplett synthetisierten DNA-Stränge. Die zur Erstellung von DNA-Fragmenten von 5-20 kb Länge verwendete *Phusion<sup>TM</sup>High-Fidelity DNA Polymerase* ist eine modifizierte *Pfu*-Polymerase, die aufgrund ihrer hohen Aktivität nur kurze Extensionszeiten von 15 bis 30 s/kb benötigt. Der Ansatz wurde entsprechend des Herstellerprotokolls vorbereitet mit 1 U Polymerase, 10 ng Template und je 25 pmol Primer. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.1.9 aufgeführt. Die abschließenden Schritte der DNA-Präzipitation in Ethanol und Natriumacetat sowie des Waschens der DNA-Pellets wurden durch die Medigenomix GmbH (Martinsried, Deutschland) durchgeführt, wo auch die Annotationen an einem *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems) vorgenommen wurde. Die Auswertung der Analyse in unserem Labor erfolgte mit den Programmen *Sequence Navigator* und *Vector NTI*.

### 2.2.2 Site-directed Mutagenesis (SDM)

Die ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*, SDM) dient dem zielgenauen Einführen von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in eine Doppelstrang-DNA (dsDNA), beispielsweise um genetische Polymorphismen in einem Wildtypgen zu erzeugen (Flavell u. a. 1975, Hutchison u. a. 1978, Müller u. a. 1978). Ausgehend vom Wildtyp-Expressionsvektor wurden in dieser Arbeit mittels SDM Punktmutationen in das im pENTR-Vektor enthaltene *ADRB2*-Gen eingeführt, um BRET-Expressionsvektoren für Varianten des  $\beta$ 2-Adrenorezeptorproteins zu erhalten. Mittels SDM wurden aus dem *ADRB2*-Wildtyp durch Austausch einzelner Basenpaare die Varianten *ADRB2* rsrs1042713 und rs1042714 erzeugt. Man nutzt hierbei in einem PCR-basierten Verfahren die nicht ganz korrekte Anlagerung von „fehlerhaften“ Primern an

den Vorlagenstrang. Dazu verwendet man zwei komplementäre Primer, die in der Mitte die gewünschte Mutation enthalten, ansonsten aber der Matrize korrekt entsprechen. Alle SDM wurden mit dem *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Die Primer wurden unter Verwendung des *QuikChange® Primer Design Programm* entworfen und durch die Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt, gereinigt und lyophilisiert. Die Primer wurden auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Als Matrizen-DNA diente eine Mini-Präparation aus einer *Escherichia coli*-Kultur mit pENTR-ADRB2-Wildtyp-cDNA. Für den Reaktionsansatz wurden 5 µl Reaktionspuffer, 50 ng Matrizen-DNA, jeweils 125 ng des Vorwärts- und des Rückwärtsprimers, 20 nmol des dNTP Mix und 50 µl Aqua bidestillata vermischt. Dann wurde 1 µl (2,5 Einheiten/µl) der *PfuTurbo®* DNA-Polymerase zugegeben. Die Polymerase synthetisiert von den Primern aus das gesamte Plasmid (codierender Strang und Gegenstrang) und erstellt so eine DNA mit der gewünschten Mutation. Das Thermal Cycling erfolgte nach folgendem Protokoll: einmalige initiale Denaturierung (95 °C, 2 min), 16-mal Denaturierung (98 °C, 1 min), Annealing der Primer (55 °C, 1 min) und Elongation (68 °C, 1 min/1 kb), schließlich einmalige finale Replikation (68 °C, 5 min). Nach dem Durchlaufen der PCR-Zyklen wurde der Reaktion 1 µl des *DpnI*-Restriktionsenzym (10 Einheiten/µl) zugesetzt, die Probe vorsichtig vermischt und bei 37 °C für 1 h inkubiert, um die methylierte Matrizen-DNA zu zerstören, sodass nur das lineare unmethylierte PCR-Produkt in der Probe verblieb. Die Matrizen-DNA ist methyliert, da sie aus *Escherichia coli* gewonnen wurde, während das PCR-Produkt in der PCR-Reaktion nicht methyliert und deshalb durch *DpnI* nicht abgebaut wird. Zur Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion und der Fragmentlänge des PCR-Produktes wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben. Zugleich wurde das in der PCR entstandene lineare DNA-Produkt durch Hitzeschocktransformation in *Escherichia coli* XL1-blue übertragen, siehe hierzu Abschnitt 2.2.4, um das PCR-Produkt zu amplifizieren und in eine geschlossene Plasmid-DNA umzuformen. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Medigenomix GmbH (Martinsried, Deutschland) übernommen.

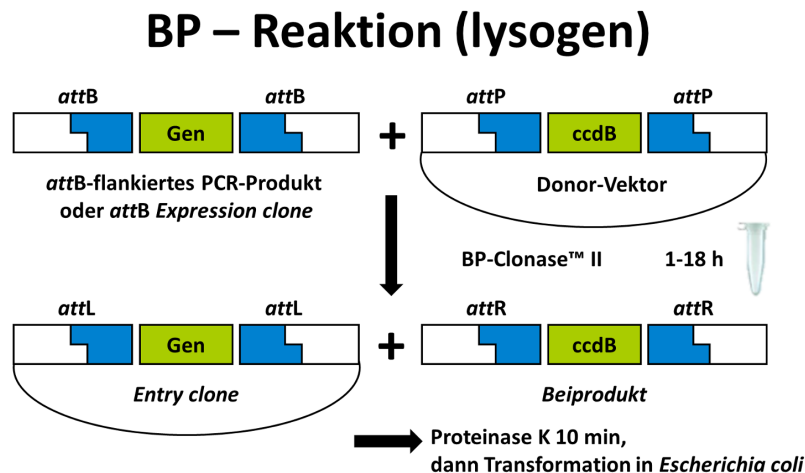
### 2.2.3 Recombinantes Klonieren mittels *Gateway® Cloning System*

Um die in Abschnitt 2.1.9 aufgeführten BRET-Vektoren zu erzeugen, wurde das auf dem Prinzip der Rekombination basierende *Gateway® Cloning System* verwendet. Dieses effiziente Klonierungssystem basiert auf einer lysogenen BP- und der lytischen LR-Reaktion und wurde durch die Firma Invitrogen bzw. life<sup>TM</sup> technologies entwickelt (Gray u. a. 1982, Katzen 2007). In der BP-Reaktion wird aus einem Donor-Vektor (pDONR<sup>TM</sup> bzw. pENTR) und einem PCR-Produkt durch das Enzym Integrase des Bakteriophagen *lamda* ein *entry clone* erzeugt (Meissner u. a. 1987). Die Integration eines DNA-Abschnitts durch die Integrase ist möglich, sofern am 3'- und am 5'-Ende der cDNA notwendigen ca. 25 bp langen *attB*-Rekombinationsstellen vorliegen. Die *entry clones* dienen dann als eine Genbibliothek, da aus ihnen mit geringem Aufwand und unter der Verwendung von Expressionsvektoren wie pDEST<sup>TM</sup> in der LR-Reaktion verschiedene *expression clones* er-

stellt werden können. Durch die Rekombination wird aus den Zielvektoren jeweils das Selbstmordgen *ccdB* entfernt und durch das Zielgen ersetzt, zudem wird die Selektion der erfolgreich transformierten Klone durch die in den Vektoren enthaltenen Antibiotikaresistenzen (pENTR - Kanamycin; pDEST - Ampicillin) ermöglicht.

### Entryvektoren

Das Ziel der BP-Reaktion ist das Erzeugen eines *entry clones*, der die cDNA des gewünschten Gens enthält. Hierzu wurde die *ccdB*-Kassette des pDONR<sup>TM</sup> mit der cDNA des gewünschten Gens durch rekombinante Klonierung ersetzt. Damit in den *expression clones* das Gen von Interesse schließlich im korrekten Leserahmen angeordnet ist, wurden die *attB*-Rekombinationsstellen für beide Enden des cDNA-Abschnitts unterschiedlich konstruiert, sodass sie nach der Integration in den pDONR<sup>TM</sup> an den *attP*-Rekombinationsstellen die richtige Orientierung erhielten (Katzen 2007).



**Abbildung 2.2:** BP-Reaktion (Abbildung nach Vorlage von life<sup>TM</sup> technologies)

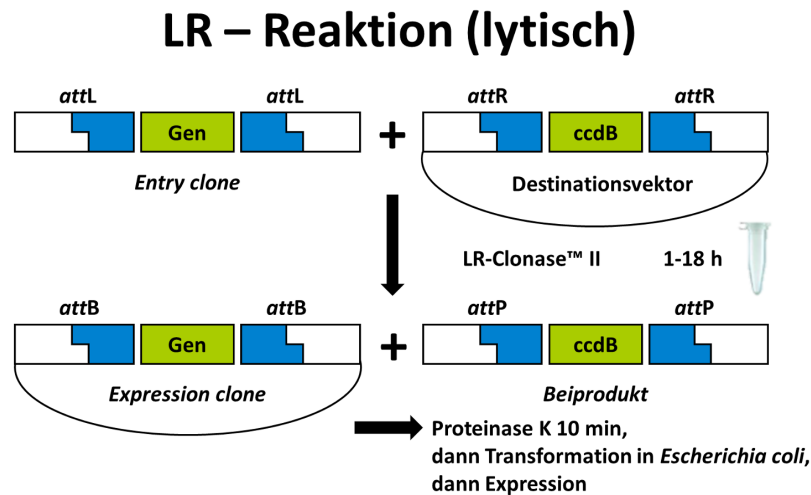
Für alle Proteine von Interesse wurden die cDNA als vollständiger Offener Leserahmen (OLR) mit und ohne Stopcodon entweder bereits in Gateway<sup>®</sup>-*entry clones* aus der cDNA-Bibliothek PlasmID (<http://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/>) erworben oder aus der cDNA-Bibliothek Mammalian Gene Collection (<http://mgc.nci.nih.gov/>) bezogen. Wenn die cDNA bereits in *entry clones* mit und ohne STOP-Codon enthalten war (PlasmID, siehe auch Tabelle 2.11), war keine BP-Reaktion notwendig und die *entry clones* konnten direkt in der LR-Reaktion eingesetzt werden. Für die cDNAs aus der Mammalian Gene Collection (siehe auch Tabelle 2.11) hingegen mussten zunächst die OLR in einer PCR (Abschnitt 2.2.1) amplifiziert und mit den 5'- und 3'-*attB*-Rekombinationsstellen versehen werden. Dabei konnten die *attB*-Rekombinationsstellen durch eine PCR mit

spezifischen Primern, die am 5'-Ende die *attB*-Rekombinationsstellen tragen, an das zu exprimierende Gen angefügt werden. Verwendet wurde das *Expand High Fidelity* PCR System wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Die Primer enthielten am 5'-Ende die 25 Basen langen *attB1*- und *attB2*-Sequenzen und 4 Guanin-Reste. Bei Fusionskonstrukten mit N-terminal gelegenen Tagproteinen wurde das START-Codon des Gens entfernt, um einen alternativen Transkriptionsstartpunkt zu vermeiden. Diese Produkte, die am 3'-Ende des untersuchten Gens ein STOP-Codon enthalten, werden in der vorliegenden Arbeit mit „STOP“ benannt. In Fusionskonstrukten, welche C-terminal das Tag tragen, wurde das STOP-Codon aus der cDNA-Sequenz entfernt. Diese Produkte werden in der vorliegenden Arbeit als „ΔSTOP“ bezeichnet, da sie am 3'-Ende des untersuchten Gens kein Stopcodon enthalten. Die Überprüfung der Produktlänge erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Hatte das PCR-Produkt die korrekte Länge und waren keine unspezifischen Produkte im Gel zu finden, so erfolgte die Aufreinigung und Quantifizierung der DNA (Abschnitt 2.2.6). Die Übertragung der komplementäre DNS (cDNA)-Sequenzen in den pDONR<sup>TM</sup>-Vektor erfolgte dann entsprechend dem Gateway<sup>®</sup>-Protokoll in der BP-Reaktion (Katzen 2007). Zunächst wurden 4 µl Reaktionslösung aus 50 fmol des cDNA-PCR-Produkts, 50 fmol des pDONR<sup>TM</sup> und sowie TE-Puffer bei RT angesetzt. Die einzusetzende Menge an PCR-Produkt wurde berechnet anhand der Formel  $cDNA - Menge [ng] = Ziel - Menge [fmol] \times Basenlänge \times (660 \text{ fg/fmol}) \times (1 \text{ ng}/10^6 \text{ fg})$ . Die BP-Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl des BP Clonase II Enzym Mix gestartet und der Reaktionsansatz für 5-18 h bei 25 °C inkubiert, dann wurde die Fusionsreaktion durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und 10-minütige Inkubation bei 37 °C unterbrochen (siehe auch Abbildung 2.2). Anschließend erfolgte die Transformation von *Escherichia coli* DH5α wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Zu jedem Protein wurden zwei entsprechende *entry clone* erzeugt, mit (*entry clone*-STOP) und ohne (*entry clone*-ΔSTOP) STOP-Codon in der cDNA. Alle *entry clones* wurden durch eine DNA-Sequenzierung validiert (Firma Eurofins MWG Operon, Martinsried), die Primer sind unter Tabelle 2.13 aufgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Computerprogramm *Sequence Navigator*.

### Expressionsvektoren

Das Ziel der LR-Reaktion ist die Übertragung der cDNA des in den *entry clones* vorliegenden Gens in einen Zielvektor (pDEST), der zugleich die Gensequenz eines Tags enthält. Der dadurch entstehende *expression clone* kann nach einer Transfektion in eukaryoten Zelllinien abgelesen und exprimiert werden (Katzen 2007).

Für die Verwendung zur Co-IP wurde die cDNA aus den Gateway<sup>®</sup>-*entry clones*-ΔSTOP in die entsprechenden *expression clones* mit C-terminalem V5- oder HA-Tag (pEF-DEST51-V5, pEF-DEST51-HA) übertragen. Für die Verwendung in BRET-Experimenten wurden die cDNA entweder aus den Gateway<sup>®</sup>-*entry clones*-ΔSTOP in die C-terminal fusionierten (C-hRluc-pDEST oder C-Venus-pDEST) pDEST<sup>TM</sup>-Vektoren oder aus den Gateway<sup>®</sup>-*entry clones*-STOP in die N-terminal fusionierten (N-hRluc-pDEST oder N-Venus-pDEST) pDEST<sup>TM</sup>-Vektoren übertragen. Für jedes in den BRET-Experimenten untersuchte Protein wurden entsprechend 4 verschiedene BRET-Expressionsvektoren



**Abbildung 2.3:** LR-Reaktion (Abbildung nach Vorlage von life™ technologies)

erstellt. Die 4 verwendeten BRET-pDEST-Vektoren (C-hRluc-pDEST, C-Venus-pDEST, N-hRluc-pDEST und N-Venus-pDEST) waren basierend auf dem pcDNA 6.2. DEST *General Gateway® Vector* konstruiert worden: um die BRET-pDEST-Vektoren mit unterschiedlicher Ausrichtung der Tags zu konstruieren, wurde die Gensequenz von hRluc (pRG-TK) bzw. Venus (pEYFP-N1) (Hamdan u. a. 2005, Nagai u. a. 2002) verwendet (Tabelle 2.10), mit (5'-Richtung) oder ohne (3'-Richtung) Stopcodon amplifiziert und, in 5'-Richtung zur Generierung des N-terminalen Fusionsproteins oder in 3'-Richtung zur Generierung des C-terminalen Fusionsproteins, mit der *ccdB*-Kassette im korrekten Leseraster verbunden. Die BRET-pDEST-Vektoren lagen im Labor bereits vor (siehe Tabelle 2.9) (Schatz 2014). Für die LR-Reaktion wurde der Gateway® *LR-Clonase II Enzyme Mix* verwendet. Es wurden 150 ng pDEST-Vektor sowie 50-150 ng *entry clone* mit TE-Puffer auf 4 µl aufgefüllt. Die LR-Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl *LR-Clonase* gestartet, für 5-18 h bei 25 °C inkubiert und durch Zugabe von 1 µl Proteinase K und 10-minütige Inkubation bei 37 °C gestoppt (siehe auch Abbildung 2.3). Anschließend erfolgte die Transformation von *Escherichia coli* DH5α wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Als Nebenprodukt entsteht bei der LR-Reaktion auch ein das *ccdB*-Selbstmordgen tragendes Plasmid, welches zum Untergang der dieses Plasmid-exprimierenden Bakterien führt (Katzen 2007).

#### 2.2.4 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli*

In einer Transformation wird Fremd-DNA in Bakterienzellen übertragen (Avery u. a. 1944). Hierzu wurde ein Hitzeschockverfahren verwendet, in dem die kurzzeitige Erhitzung der *Escherichia coli* die Bakterienmembran eröffnet und die Einschleusung der DNA

in das Zellinnere ermöglicht. Gramnegative Bakterien sind aufgrund ihrer Zellwand normalerweise nicht fähig, DNA aufzunehmen, weshalb für das Hitzeschockverfahren die chemisch kompetenten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ - bzw. XL1-Blue-Stämme verwendet wurden. Diese Methode ermöglicht die Klonierung von Plasmid-DNA und ist damit von grundlegender Bedeutung. Die verwendeten Ansätze unterschieden sich je nach Bakterienstamm. Für Transformationsreaktionen mit *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  wurden 100  $\mu$ l der Bakterien auf Eis aufgetaut, dann mit 2  $\mu$ l der BP- oder LR-Reaktion versetzt und über 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformationsreaktion durch einen 90 s dauernden Hitzeschock in einem 42 °C warmen Wasserbad und, nach erneuter zweiminütiger Inkubation auf Eis und Zugabe von 200  $\mu$ l LB-Medium ohne Antibiotikum, die Präinkubation für 1-2 h bei 37 °C auf einem Plattenschüttler, bevor 100  $\mu$ l der gesamten Reaktionslösung auf selektive Agarplatten mit einer Kanamycin- (BP-Reaktion mit pENTR221), Spectinomycin- (BP-Reaktion mit pENTR223) oder Ampicillinresistenz (LR-Reaktion) ausgestrichen und 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Wurden *Escherichia coli* XL1-Blue verwendet, so erfolgte die Reaktion abweichend vom obigen Protokoll mit 50  $\mu$ l Bakterien, 0,1-50 ng DNA, einem Hitzepuls von 45 s und einer Präinkubation in 500  $\mu$ l LB-Medium.

### 2.2.5 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Bakterien nach der Transformation wurden Glycerinkulturen hergestellt (Swift 1921). Hierzu wurden je 5 ml LB-Medium (mit 100  $\mu$ g/ml Antibiotikum) mit transformierten Bakterien beimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Es konnten auch 5 ml einer angesetzten Hauptkultur verwendet werden. Die Kulturen wurden 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml LB-Medium mit Glycerin (1:1) resuspendiert und dann bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt. Es wurden nur solche Glycerinkulturen archiviert, die Kolonien mit einer korrekten Sequenz der Vektoren enthielten.

### 2.2.6 DNA-Aufreinigung

Nach der Erzeugung der *entry*- bzw. *expression clones* und ihrer Transformation in chemisch kompetente Bakterien erfolgte die Plasmid-DNA-Isolierung. Zur DNA-Aufreinigung wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* oder das *PureYield Plasmid Maxiprep System* verwendet, je nach Größe der angesetzten Vorkultur. Beide Systeme basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim u. a. 1979). Das *PureYield Plasmid Maxiprep System* diente zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA für die BRET-Experimente aus Bakterienkulturen von einem Volumen über 100 ml. Für das Miniprep Kit wurden 3-5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) (nach der LR-Reaktion) bzw. Kanamycin (100  $\mu$ g/ml) oder Spectinomycin (100  $\mu$ g/ml) (nach der BP-Reaktion) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit dem von der Agarplatte gepickten Klon beimpft und für 10-20 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Kultur

für 15 min bei 4600 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet weiterverarbeitet. Für das Maxiprep System wurden 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen mit dem von der Agarplatte gepickten Klon beimpft und 7-9 h bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde für die Hauptkultur 300 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) in einem Schüttelkolben (1 l) vorgelegt und dieser mit der Vorkultur beimpft. Inkubiert wurde bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttler für 16-24 h. Dann wurde die Hauptkultur bei 10.000 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet weiterverarbeitet. Die DNA-Aufreinigung erfolgte entsprechend den Protokollen der beiden Hersteller, eluiert werden mit dem Miniprep Kit bis zu 25 µg DNA in 50 µl Aqua bidestillata oder TE-Puffer und mit dem Maxiprep System bis zu 600 µg in 1 ml. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop® ND-1000 UV-Vis bestimmt. Dieses Fluorospektrometer misst die Extinktion einer DNA-Probe (1 µl) für UV-Licht der Wellenlänge 260 nm. Mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors (eine Extinktion von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml) kann die Konzentration der DNA in der Probe berechnet werden. Um eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder RNA auszuschließen, wurde zudem die UV-Extinktion für die Wellenlänge 280 nm bestimmt und der Quotient Q aus den Extinktion E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> gebildet. Für Q = 1,8 kann von einer ausreichenden DNA-Reinheit ausgegangen werden, liegt Q dagegen unter 1,8, so ist eine Kontamination mit Proteinbestandteilen zu vermuten, während über 1,8 eine Verunreinigung der DNA-Probe mit RNA vorliegt. Im Fall der Kontamination ist die Probe für die Transfektion eukaryotischer Zellen ungeeignet und wurde nicht weiterverwendet.

### 2.2.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Gelelektrophorese

Um nach dem Abschluss der Klonierung der *entry clones* bzw. der *expression clones*, der Hitzeschocktransformation und der Plasmid-DNA-Aufreinigung zu überprüfen, ob die korrekten Plasmide amplifiziert wurden, wurden die *entry clones* und die *expression clones* in einem Restriktionsverdau analysiert (Roberts 2005). Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische dsDNA-Sequenzen und hydrolysieren die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Basen (Danna u. a. 1999). Je nach der Anzahl der vorhandenen Schnittstellen in einer DNA-Sequenz und der Zahl der eingesetzten Restriktionsendonukleasen entstehen unterschiedlich große DNA-Fragmente. Für die Testung der BRET-*expression clones* wurde *FastDigest™ SalI* (1 FDU /µl) in *FastDigest™ Green Buffer 10x* verwendet. Circa 300 ng Plasmid-DNA wurde mit 0,5 µl *SalI* und *Green Buffer* in insgesamt 10 µl für 35 min bei 37 °C geschnitten. Anschließend wurde der Ansatz in *Gel Loading Solution* zusammen mit einer 1 kb plus *DNA Ladder* auf ein 0,85% Agarosegel aufgetragen und für 1 h bei 120 V, 130 mA und 20 W aufgetrennt. Die DNA-Gelelektrophorese trennt DNA-Moleküle in einem Agarosegel je nach ihrer Ladung und Größe auf, das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter Anregung mit UV-Licht und durch die mitlaufende DNA Ladder als Molekulargewichtsstandard



konnte die Größe der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau abgeschätzt werden. Durch die Auswahl der Restriktionsenzyme in Abhängigkeit von der untersuchten Plasmid-DNA konnten so charakteristische Bandenmuster erzeugt werden. Eine Fotodokumentation erfolgte unter UV-Belichtung.

### 2.2.8 Zellkultur

In den hier beschriebenen Experimenten wurden HEK-293, HEK-Flp-In™-293 und COS-7 Zellen verwendet. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an einer Arbeitsbank mit Laminarströmung statt. Als Nährmedium wurde für COS-7 Zellen RPMI-Medium verwendet, für HEK-293 Zellen DMEM-Medium. Das Medium und die antiinfektiösen Zusätze und Antibiotika wurden bei einer Temperatur von 4 °C und das FBS bei -20 °C gelagert. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> und das Nährmedium wurde alle 2 d erneuert.

#### HEK293-Zellen

Die adhärenenten HEK293-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen oder HYPERFlask® Zellkulturflaschen (1720 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) kultiviert und alle 5-7 d bei einer Konfluenz von 80-95% passagiert, allerdings höchstens 20-mal. Das Nährmedium wurde alle 2-3 d gewechselt. Zur Zellpassagierung wurde zunächst das Kulturmedium abgenommen, die Zellen wurden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von Trypsin-EDTA (1:10 in PBS + 150 µg/ml Pluronic® F-68) für ca. 7 min bei 37 °C im Brutschrank abgelöst. Dies wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte mit DMEM mit Phenolrot, die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren vermischt und endgültig vom Flaschenboden abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wurde in ein Sammelgefäß überführt, die Zellkulturflaschen anschließend zweimal mit PBS gewaschen und die beiden Waschfraktionen mit der Zellsuspension vermengt. Die so erhaltene Suspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 200 g und RT für 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in DMEM mit Phenolrot resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauerkammer erhoben. Für die weitere Kultivierung der HEK293 Zellen wurden die Zellkulturflaschen wieder mit DMEM mit Phenolrot (+10% FBS + 1% AB) und für ein Passageintervall von 7 d mit 100.000 bzw. 400.000 (HYPERFlask®) Zellen befüllt.

#### COS7-Zellen

Die adhärenenten COS7-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen oder HYPERFlask-Zellkulturflaschen (1720 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) kultiviert und alle 7 d bei einer Konfluenz von 80-95% passagiert, allerdings höchstens 20-mal. Das Nährmedium wurde alle 2-3 d gewechselt. Zur Zellpassage wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und durch die Zugabe von Trypsin-EDTA (1:10 in PBS + 150 µg/ml Pluronic® F-68) für ca. 7 min bei 37 °C im Brutschrank abgelöst. Dies

wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte mit RPMI-Medium mit Phenolrot, die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren vermischt und endgültig vom Flaschenboden abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wurde in ein Sammelgefäß überführt, die Zellkulturflaschen anschließend zweimal mit PBS gewaschen und die beiden Waschfraktionen mit der Zellsuspension gemischt. Die so erhaltene Suspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 200 g und RT für 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 20 ml RPMI mit Phenolrot resuspendiert und die Zellkonzentration mit einer Neubauerkammer erhoben. Für die weitere Kultivierung der COS7-Zellen wurde die Zellkulturflasche mit RPMI (+10% FBS + 1% AB) und für ein Passagierintervall von 7 d mit 100.000 bzw. 400.000 (HYPERFlask®) Zellen befüllt.

### 2.2.9 Transfektion

#### Transiente Transfektion durch Nukleofektion

Zur transienten Transfektion der COS-7 und der HEK-293 Zellen für die BRET- und CoIP-Experimente wurde die Nukleofektion verwendet (Martinet u. a. 2003, Trompeter u. a. 2003). Es handelt sich hierbei um eine Elektroporation, bei der durch kurzzeitige Spannungsanlage die Zellmembran eukaryotischer Zellen für den DNA-Durchtritt permeabilisiert wird. Erreicht die Spannung an den einzelnen Zellen einen kritischen Wert von 0,4 bis 1 V, so wandeln sich hydrophobe Poren von ca. 0,5 bis 1,0 nm um und werden für einige Sekunden hydrophil, sodass die hydrophile DNA in die Zellen gelangen kann. Die Nukleofektion wird in einer 96-*well*-Platte im AMAXA™Nucleofector™96-*well* Shuttle™System durchgeführt. Nur für große Zellmengen, beispielsweise für die Experimente zur Oberflächenexpression im Western Blot, wurden Einzelküvetten verwendet mit 1.000.000 Zellen pro Transfektion. Für die Transfektion in 96-*well*-Platten werden 200.000 Zellen pro *well* (Gesamtmenge pro Platte ca. 23.000.000 Zellen:  $200.000/\text{well} \times \text{Anzahl der wells} \times \text{Totvolumen-Faktor } 1,2 + \text{Totvolumen}$ ) verwendet, die aus der bereits gezählten Zellsuspension nach dem passagieren der Zellen entnommen werden. Je 200.000 Zellen werden in 20 µl AMAXA Puffer (Gesamtmenge pro Platte:  $20 \mu\text{l}/\text{well} \times \text{Anzahl der wells} \times \text{Totvolumen-Faktor } 1,2 + \text{Totvolumen}$ ) zusammen mit 0,8 µg DNA resuspendiert und dann für COS-7 Zellen mit dem Programm A-024 bzw. für HEK-293 Zellen mit dem Programm DS-130 transfiziert. Die genaue Zusammensetzung der hinzugegebenen Plasmid-DNA hängt von der Art des Experiments ab, für BRET-Interaktionsexperimente werden 0,2 µg Donor-Plasmid-DNA und 0,6 µg Akzeptor-Plasmid-DNA verwendet und für die Sättigungsexperimente bei einer gleichbleibenden Gesamtmenge an Plasmid-DNA von 0,2 µg entsprechende Akzeptor/Donor-Verhältnisse von 3:1, 1:1, 1:3, 1:6, 1:12 und 1:18. Jeder Ansatz wird in Duplikaten durchgeführt. Anschließend wird jedem *well* nach einer kurzen Ruhezeit von 5 min 80 µl Medium ohne Phenolrot zugegeben und mit der Multikanalpipette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Dann werden pro *well* 80 µl der transfizierten Zellen entnommen, in eine 96-*well*-Microtestplatte mit weißem Boden übertragen, in der bereits pro *well* 120

µl Medium ohne Phenolrot vorgelegt wurden, und für 18-24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben weiter verfahren wird.

### Stabile Transfektion

Zur stabilen Transfektion wurden HEK-Flp-In<sup>TM</sup>-293 Zellen verwendet und die folgenden (eine Hygromycin-Resistenz tragenden) Vektoren transfiziert, jeweils in Triplikaten: pEF-FRT/V5-ADRB2-rs1042713, pEF-FRT/V5-ADRB2-rs1072714, pEF-FRT/V5-ADRB2, pCD001-ORMDL1, pCD001-ORMDL2, pCD001-ORMDL3. Zunächst wurden pro Transfektion 500.000 HEK-Zellen in einem *well* einer 6-*well*-Platte in 1,5 ml DMEM High Glucose mit 10% FBS und 1% Antibiotikum-Antimikotikum Mischung für 24 h inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und nach Waschen mit warmem PBS wurde 1,5 ml DMEM High Glucose mit 10% FBS und 1% Antibiotikum-Antimikotikum Mischung hinzugegeben. Die Transfektion erfolgte mit *DreamFect*<sup>TM</sup> nach dem Protokoll des Herstellers. In 100 µl DMEM ohne FBS und ohne Antibiotikum wurden 8 µl *DreamFect*<sup>TM</sup> und in weiteren 100 µl DMEM ohne FBS und ohne Antibiotikum 0,2 µg Plasmid-DNA und 1,8 µg pOG44 DNA vorbereitet. Das Medium mit *DreamFect*<sup>TM</sup> und das Medium mit der DNA wurden vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde je ein Transfektionsgemisch einem *well* hinzugefügt und die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Der pOG44-Vektor führt zur Expression der Flp Recombinase (Buchholz u. a. 1996), die in Flp-In<sup>TM</sup> Zelllinien an den Flp *recombination target* Rekombinationsstellen den Einbau eines Gens beispielsweise aus pEF-FRT-Vektoren ermöglicht und somit die Etablierung von Zelllinien, die das gewünschte Gen stabil exprimieren. pOG44 trägt keine Antibiotikumresistenz, sodass in der weiteren Kultivierung der stabil transfizierten Zelllinie der pOG44-Vektor verloren geht. Eine untransfizierte Probe wurde als Kontrolle mitgeführt. In der Folge wurde das Wachstum beobachtet und 2-mal in der Woche Medium gewechselt, wobei frühestens nach 2 d Medium mit 1% Hygromycin verwendet wurde. Nach 2 Wochen wurden unter dem Mikroskop jeweils 3 Klone pro Vektor ausgewählt und in eine neue 6-*well*-Platte übertragen. Nach weiteren 2 d wurde dann zur Selektion bei jedem Mediumwechsel 100 µl Hydromycin in 50 ml Medium hinzugefügt und nach 10 d konnten die Zellen in Flaschen weiter passagiert werden. Die einzelnen Proben wurden aufbereitet und mittels Antikörper und Western Blot auf die Expression der Konstrukte getestet. Solche Klone, die die Konstrukte exprimierten, wurden weiter kultiviert. Zudem wurden jeweils 2 Millionen Zellen in einer Lösung aus 50% FCS, 3% DMSO, 47% LB-Medium bei -80 °C eingefroren.

## 2.2.10 Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET)

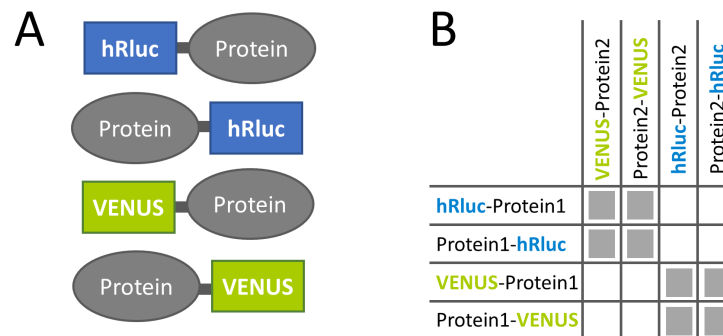
### BRET Prinzip

Zur Untersuchung der in dieser Arbeit dargestellten PPI wurde eine auf dem Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) beruhende Methode verwendet. Das Prinzip der Klonierung der hierfür verwendeten DNA-Konstrukte wurde in Abschnitt 2.1.9

dargestellt, die verwendeten DNA-Sequenzen finden sich in Abschnitt 2.1.9. In dieser Arbeit wird die BRET<sub>1</sub>-Variante (Y. Xu u. a. 1999) genutzt unter der Verwendung der Coelenterazin (CTZ)-Variante ViviRen<sup>TM</sup>. ViviRen<sup>TM</sup> *Live Cell Substrate* wird erst intrazellulär durch zelleigene Esterasen der Luciferase zugänglich gemacht (Kimura u. a. 2010) und ermöglicht so die Beschränkung der BRET-Signale auf lebende Zellen. Zudem bietet BRET<sub>1</sub> unter der Verwendung von ViviRen<sup>TM</sup> die beste Quantenausbeute. Als Donorprotein wurde die humanisierte Variante der Renilla Luciferase hRluc verwendet, als Akzeptor die Venus-Variante (Nagai u. a. 2002, Hamdan u. a. 2005) des YFP. Die zu untersuchenden Proteine müssen hierzu zunächst genetisch mit den Donor- bzw. Akzeptorproteinen verbunden werden. Alle potenziellen Interaktionspartner wurden daher in die beschriebenen *expression clones* eingefügt, sodass für jedes Protein 4 verschiedene zu Verfügung stehen, die zur Expression folgender Proteinvarianten führen: N-terminal durch hRluc- bzw. Venus-Tag markierte Proteine und C-terminal durch hRluc- bzw. Venus-Tag markierte Proteine.

### BRET Interaktionsexperimente

Die BRET-Interaktionsexperimente dienen dazu, eine mögliche Interaktion zweier Proteine zu untersuchen. Für jedes Proteinpaar werden 8 Experimente mit den folgenden Kombinationen an Expressionsvektoren durchgeführt: Aufgrund der geringen maxi-



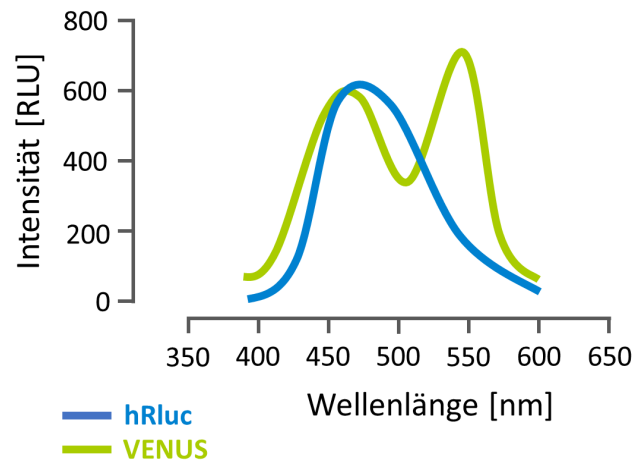
**Abbildung 2.4:** Markerkombinationen der BRET-Paare (A) Jedes untersuchte Protein ist N- bzw. C-terminal mit hRluc bzw. Venus markiert (B) Matrix für alle Markerkombination pro Proteinpaar. Es ergeben sich je 8 BRET-Experimente (Abbildung nach Gersting u. a. 2012).

malen Distanz (10 nm) des Biolumineszenz-Resonanzenergietransfers kann schon die unterschiedliche räumliche Orientierung der Akzeptor- und Donortags dazu führen, dass PPI falsch negativ bestimmt werden. Die Untersuchung aller 8 möglichen Tag-Kombination (Markerkombinationen) pro PPI erhöht die Sensitivität deutlich (Gersting

u. a. 2012). So konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Rate der richtig positiven Interaktionen bei der Verwendung einer jeweils N-terminal markierten Proteinpaars nur bei ca. 34% liegt, während die Verwendung aller 8 möglichen Kombinationen zu einer Rate von 58% führt (innerhalb des zusätzlich verbesserten iBRET-Algorithmus). Für die Untersuchung von Homooligomeren ergeben sich nur 4 mögliche Kombinationen. Für jedes einzelne Experiment wurden COS-7 Zellen mit einem 1  $\mu$ g DNA transfiziert, bei einem Akzeptor/Donor-Verhältnis von 3:1, wie in Abschnitt 2.2.10 im Folgenden genauer beschrieben. Die BRET-Ratio wurde berechnet als

$$R = I_A/I_D - C_f$$

mit  $I_A$  = Intensität der Lichtemission bei 535 nm (Akzeptor),  $I_D$  = Intensität der Lichtemission bei 475 nm (Donor) und  $C_f$  = Korrekturfaktor =  $BRET_{control}/Rluc_{control}$ . Durch das breite Emissionsspektrum von hRluc, das auch im Fall einer negativen Interaktion zu einem detektierbaren Signal bei 535 nm und somit einer BRET-Ratio führt, ist die Nutzung von Negativkontrollen auf jeder 96-*well*-Platte notwendig. Die Negativkontrolle, das  $Rluc_{control}$ -Konstrukt, wurde durch die Expression eines Donorfusionsproteins ohne gleichzeitige Expression eines Akzeptorproteins umgesetzt, hier wurde der pDEST-PEX19-hRluc Vektor verwendet im Verhältnis 1:3 mit dem pcDNA3.1-PAH Vektor bei gleicher Gesamtmenge an DNA im *well* wie für die Interaktionsexperimente. Als Positivkontrolle diente die Transfektion mit dem pDEST Venus-hRluc-Fusionsvektor als  $BRET_{control}$ -Konstrukt. Als dritte Kontrollbedingung diente ein *well*, in dem vor der Transfektion keine Desoxyribonukleinsäure (DNA) zugegeben wurde. Für die Beurteilung der Interaktionsexperimente ist eine möglichst korrekte Identifikation der positiven und negativen Interaktionen notwendig. Sowohl die Rate der falsch-positiv wie auch der falsch-negativ bestimmten Interaktionen muss minimiert werden. Dies bedeutet, dass eine möglichst große Zahl an positiven Interaktionen tatsächlich als positiv erkannt werden muss (möglichst hohe Sensitivität) bei gleichzeitiger Minimierung der fälschlich als positiv erkannten negativen Interaktionen (möglichst hohe Spezifität). Die optimalen Schwellenwerte zur Bewertung positiver und negativer Interaktionen wurden an einem Referenzdatensatz experimentell etabliert. Diese Experimente erfolgten in der Arbeitsgruppe Molekulare Pädiatrie, waren jedoch nicht Teil dieser Dissertation. Die experimentelle Etablierung der Schwellenwerte wird jedoch im Folgenden zum besseren Verständnis der Methode geschildert. Dieser Referenzdatensatz bestand aus 61 bekannten positiven PPI-Paaren (Positiver Referenzdatensatz, PRS) und 60 zufällig aus allen verfügbaren Proteinen gezogenen Paaren (Zufälliger Referenzdatensatz, *random reference set*, RRS), für die in entsprechend der Literaturrecherche keine PPI bekannt waren (Tabelle 5.1). Die 61 bekannten, positiven Interaktionen wurden aus Interaktionsdatenbanken wie BIOGRID und ensembl ausgewählt und entsprechend der Qualität der experimentellen Evidenz der positiven PPI gewichtet (Cusick u. a. 2009). Da eine Auswahl negativer Interaktionen aus der Literatur nicht möglich ist, wurde eine zufällige Auswahl von 60 Proteinpaaren aus unserer cDNA-Datenbank gezogen, die das gleiche



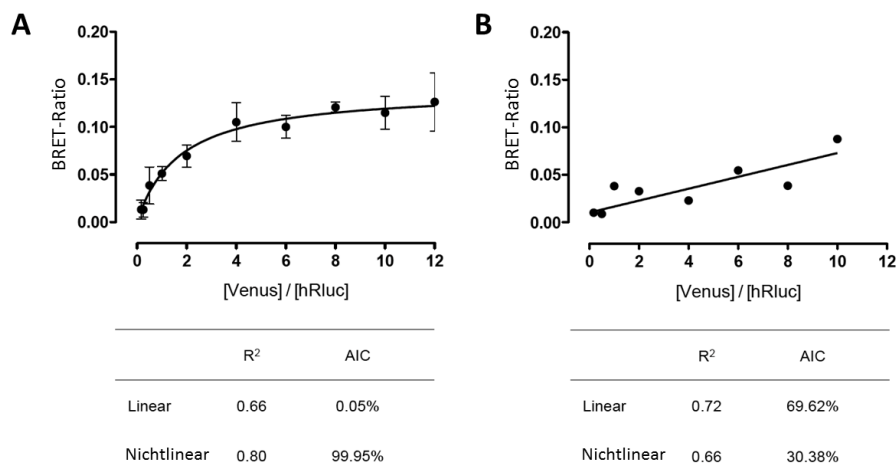
**Abbildung 2.5:** Emissionsspektren von hRluc und dem Fusionskonstrukt Venus-hRluc. Aufgrund der spektralen Überlappung der Lumineszenz-Emissionen von hRluc (485 nm) und Venus (535 nm) kommt es zum Durchbluten der Donor-Emission im Detektionskanal der Akzeptor-Emission. (Abbildung nach Gersting u. a. 2012)

subzelluläre Verteilungsmuster wie das PRS aufweisen, allerdings unter Ausschluss bereits in der Literatur belegter positiver Proteinpaaire. Da positive Interaktionen innerhalb des RRS unwahrscheinlich sind und in Ermangelung eines Goldstandards für die Auswahl negativer Interaktionen handelt es sich um ein allgemein akzeptiertes Vorgehen zur Etablierung einer negativen Referenzauswahl (Braun u. a. 2008). Die Schwellenwerte für das Luciferasesignal sowie der BRET-Ratio wurden anhand von PRS und RRS trainiert und validiert in einem supervidierten Ansatz. Dafür wurde zunächst das niedrigste mögliche Luciferasesignal so bestimmt, dass die Anzahl der Interaktionen aus dem PRS mit einer höheren BRET-Ratio als irgendein Proteinpaaire aus dem RRS maximal war. Der obere Schwellenwert wurde dann festgelegt als Mitte der höchsten BRET-Ratio einer negativen Interaktion und der nächsthöheren BRET-Ratio einer positiven Interaktion. Der untere Schwellenwert wurde danach so determiniert, dass die Fraktion der positiven Interaktionen (aus dem PRS) über dem unteren Schwellenwert maximiert wurde. Über eine 10-fache Kreuzvalidierung mit 100 Wiederholungen wurden die Schwellenwerte als Median sowie die Gütekriterien des hier vorgestellten BRET-Protokolls für Interaktionsexperimente bestimmt (Cusick u. a. 2009, Venkatesan u. a. 2009). Für diese Kreuzvalidierung wurden der PRS und der RRS zufällig in 10 Gruppen geteilt, von denen eine Gruppe zur Testung und die jeweils anderen 9 Gruppen zum Training verwendet wurden. Die falsch positiven (FP), die richtig positiven (*true positive*, TP), die falsch negativen (FN) und die richtig negativen (TN) sowie die positiven und negativen Interaktionen im Graubereich (PA und NA) und die positiven und negativen Interaktionen, bei denen alle 8 Messkombinationen unterhalb des Luciferaseschwellenwerts liegen (PI und NI), wurden für jede Kreuzvalidierung berechnet und über alle Wiederholungen gemittelt. Unter Verwendung des dargestellten

Algorithmen wurden die folgenden Güteparameter für BRET-Interaktionsexperimente in unserem Labor ermittelt (Stand 20.10.2009, anwendbar auf alle im folgenden dargestellten BRET-Interaktionsexperimente bei unverändertem BRET-Protokoll): TP: 30,17 (49,46%); FN: 29,72 (48,72%); TN: 56,67 (94,45%); FP: 2,15 (3,58%); PA: 1,11 (1,82%); NA: 1,18 (1,97%); PI: 0,0 (0,0%); NI: 0,0 (0,0%); PPV: 93,35%; TPR: 49,46%; FPR: 3,58%; PAR: 48,47%. Zusammenfassend lassen sich mit der in dieser Arbeit angewandten BRET-Methodik nur die Hälfte aller vermutlich vorliegenden Interaktionen nachweisen (TP 49,46%) bei einem allerdings hohen positiv prädiktiven Wert (PPV) von 93,35% unter der Voraussetzung, dass der mediane untere Schwellenwert nach Kreuzvalidierung (*median lower threshold across cross-validations*, LT) bei 0,0859 gesetzt wird, der mediane obere Schwellenwert nach Kreuzvalidierung (*median upper threshold across cross-validations*, UT) bei 0,0915 und der mediane Luciferase-Schwellenwert nach Kreuzvalidierung (*median luciferase signal cutoff across cross-validations*, CO) bei 15618,0 RLU. Entsprechend werden die BRET-Ratios einer PPI als positiv gewertet, wenn sie bei mindestens 0,0915 liegen. Unterhalb des unteren Schwellenwerts von 0,0859 werden PPI als negativ bewertet. Der Bereich zwischen den beiden Schwellenwerten wird als Graubereich angesehen und macht die weitere Untersuchung der PPI in einem Sättigungsexperiment notwendig zur weiteren Differenzierung. Eine PPI wird als gegeben angenommen, wenn die BRET-Ratio für mindestens eine der 8 Kombinationen über dem oberen Schwellenwert (UT) liegt. Diese Interaktionen sind in den Tabellen des Ergebnisteils grün hinterlegt. Eine Interaktion wird nur dann als negativ angesehen, wenn alle 8 Kombinationen unter dem unteren Schwellenwert (LT) liegen. Diese Interaktionen sind in den Tabellen des Ergebnisteils rot hinterlegt. Wenn mindestens eine der gemessenen Kombinationen eine BRET-Ratio innerhalb des Graubereichs aufweist, während die anderen Kombinationen unterhalb des unteren Schwellenwerts (LT) liegen, so erfolgt die weitere Differenzierung mittels BRET-Sättigungskurven (Gersting u. a. 2012).

### BRET-Sättigungsexperimente

Die BRET-Sättigungsexperimente dienen (1) der Überprüfung von Interaktionen, die in den Interaktionsexperimenten im methodenspezifischen Graubereich (Gersting u. a. 2012) lagen, (2) der Bestimmung möglicher Konformationsunterschiede sowie (3) der Bestimmung der Bindungsaffinität zweier Proteine (J. R. James u. a. 2006). Für jede Interaktion wurden Zellen wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben transfiziert mit 1  $\mu$ g DNA in verschiedenen Donor/Akzeptor-Verhältnissen: 6:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:6, 1:12, 1:18 (Hamdan u. a. 2006, Mercier 2002, Oner u. a. 2010). Die BRET-Ratio wurde für jedes Experiment (wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben) und jedes DNA-Verhältnis berechnet. Die sequentielle Erhöhung des Verhältnisses von Akzeptor (Venus) zu Donor (hRluc) ergibt für spezifische Interaktionen eine hyperbole Kurve für die BRET-Ratios mit  $B_{max}$  als Plateau, wenn alle Donorproteine mit einem Akzeptor gesättigt sind. Im Gegensatz hierzu ergibt sich für den Fall eines unspezifischen, zufälligen Aufeinandertreffens der beiden Proteine (*bystander* BRET), die den Donor bzw. Akzeptor tragen, eine fast lineare Zunahme der BRET-Ratio ohne das Erreichen eines Plateaus, wodurch die Sättigungsexperimente



**Abbildung 2.6:** BRET-Sättigungsexperimente: Die Zellen werden mit einem zunehmenden Akzeptor/Donor-Verhältnis transfiziert. Gezeigt sind hier Beispieldaten für (A) FYN + CD2 (positive Interaktion) und (B) PEX11A + COPS5 (negative Interaktion).  $R^2$  und das Akaike Informationskriterium (AIC) zeigen die Anpassungsgüte an. Eine nicht-lineare hyperbolische Form der BRET-Ratio ist hinweisend auf eine spezifische Interaktion, während eine lineare Zunahme der BRET-Ratio durch zufällige Kollisionen der Proteine (*bystander BRET*) verursacht wird.

sich zur Differenzierung zwischen positiven und falsch positiven Interaktionen eignen (Abbildung 2.6, J. R. James u. a. 2006, Mercier 2002). Für hyperbole Kurvenverläufe lässt sich neben der  $B_{max}$  als maximale BRET-Ratio auch die Dissoziationskonstante  $K_D = BRET_{50}$  als das Donor/Akzeptor-Verhältnis, bei dem die halbmaximale  $B_{max}$  erreicht wird, bestimmen.

### BRET Protokoll

COS-7 oder HEK-293 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80-95% kultiviert. Die DNA wurde in 12-*well* PCR-Ketten vorgelegt, jeweils für ein Duplikat pro *well*. Die Gesamtzahl der verwendeten *wells* der 96-*well*-Platte kann wie folgt berechnet werden:  $n * 8 * 2 + 9$  ( $n$  = Anzahl der zu testenden Proteinpaaire, 8 = Anzahl der Akzeptor-Donor-Kombinationen, 2 = Duplikate pro Proteinpaaire und Kombination, +9 = Kontrollexperimente pro 96-*well*-Platte). Die Zellen wurden transfiziert (siehe 2.2.9) und für 24 h inkubiert. Danach wurde das Medium aus den *wells* entfernt, die *wells* zweimal mit je 200  $\mu$ l PBS pro *well* gewaschen, 30  $\mu$ l auf 37 °C vorgewärmtes Medium ohne Phenolrot pro *well* hinzugefügt und die Platte im 96-*well* Mikroplatten Luminometer LUMIstar OPTIMA gemessen. Das Gerät ist mit zwei Filtern für die Detektion der hRluc-Emission (475 nm  $\pm$  30 nm) sowie der Venus-Emission (535 nm  $\pm$  30 nm) ausgestattet. Zuvor wurde die Expression der Venus-Konstrukte unter dem Fluoreszenzmikroskop vor jeder Lumineszenzmessung verifiziert. Zeitgleich wurde das Substrat für die BRET-Messung



vorbereitet, indem ViviRen<sup>TM</sup> (Zielkonzentration 60  $\mu\text{M}$ ) in einer Verdünnung von 1:700 mit Medium ohne Phenolrot gemischt wurde. Diese Verdünnung wurde maximal 24 h verwendet. Jedem *well* der 96-*well*-Platte wurden durch eine Pumpe im LUMIstar OPTIMA 70  $\mu\text{l}$  Substrat zugesetzt, sodass ViviRen<sup>TM</sup> schließlich in einer Konzentration von 1:1000 zum Zeitpunkt der BRET-Messung vorlag. Die Messung der einzelnen *wells* erfolgte jeweils 2 min nach der Injektion von CTZ, um die Diffusion des lipophilen Substrat in die Zelle, die Aktivierung durch Spaltung der Esterbindung und die Bindung an hRluc zu ermöglichen. Die Lichtemission wurde pro *well* für 10 s gemessen, wobei die Detektion der Lumineszenz bei 475 nm (hRluc-Signal) und der Fluoreszenz bei 535 nm (Venus-Signal) über je 1 s im Wechsel erfolgte.

### BRET mit Medikamentenzugabe

Um BRET-Sättigungsexperimente mit ORMDL und mit dem  $\beta_2$ -AR unter dem Einfluss von  $\beta$ -Sympathomimetika durchzuführen, wurden die Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK-293) Zellen vor der Fluoreszenzmessung mit den folgenden Medikamentenkonzentrationen inkubiert: Salmeterol 0,2  $\mu\text{M}$ , Salbutamol 1,25  $\mu\text{M}$ , Isoproterenol 1,0  $\mu\text{M}$  bzw. Clenbuterol 0,5  $\mu\text{M}$ . Die Injektion von  $\beta$ -Sympathomimetikum und dem hRluc Substrat Coelenterazin erfolgte sequentiell, sodass Salbutamol, Clenbuterol und Isoproterenol (Wirkbeginn nach ca. 2-5 min (Johnson 1990)) jeweils 15 min und Salmeterol (Wirkbeginn nach ca. 30 min (Johnson 1990)) 60 min vor der BRET-Messung zugegeben wurden.

#### 2.2.11 Koimmunpräzipitation (Co-IP)

Auch die Koimmunpräzipitation (Co-IP) wird zum Nachweis von PPI verwendet. Diese biochemische Methode nutzt Antikörper, um ein bestimmtes Antigen aus einer Zelllösung zu isolieren (*pulldown-assay*) und nachfolgend durch Zugabe eines weiteren Antikörpers oder auch durch andere Methoden wie beispielsweise die Massenspektrometrie weitere im *pulldown-assay* enthaltene Proteine zu identifizieren, die über ihre Bindung an Antigen-tragende Proteine mit herausgezogen wurden (Bjorck u. a. 1984, Kaboord u. a. 2008). Hierzu wurden in dieser Arbeit COS-7 Zellen transfiziert (siehe 2.2.9) mit den zu untersuchenden Interaktionspartnern, welche C-terminal entweder ein HA-Tag oder einen V5-Tag tragen. Die Zellen wurden nach 48 h Wachstum lysiert durch Sonifikation auf Eis für zweimal 15 s, eine nachfolgende Zentrifugation mit 1000 g über 10 min, eine Zentrifugation des Überstands bei 20.000 g für 25 min und eine Resuspension des Pellets in Koimmunpräzipitation (*Co-Immunoprecipitation*) (Co-IP)-Lysepuffer. Dann wurden 200  $\mu\text{l}$  Zelllysats mit 2,5  $\mu\text{l}$  des Ratten Anti-Hämagglutinin Antikörpers (Anti-HA) (1:48 Verdünnung) und 50  $\mu\text{l}$   $\mu\text{Mac}$  Beads (1:7 Verdünnung) für 30 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die  $\mu\text{Mac}$ -Säulen (pro Interaktionskombination eine Säule) durch das Waschen mit 200  $\mu\text{l}$  Co-IP-Lysepuffer vorbereitet, der Durchlauf wurde verworfen. Die präequilibrierten  $\mu\text{Mac}$ -Säulen wurden mit dem Zelllysats geladen und zweimal mit 200  $\mu\text{l}$  Co-IP-Lysepuffer gewaschen. Diese Waschfraktionen wurden

für die weitere Analyse aufgefangen. Jede Säule wurde anschließend zweimal mit 200  $\mu$ l PBS und einmal mit 100  $\mu$ l Co-IP-*Low-Salt*-Puffer gewaschen. Nun wurden 20  $\mu$ l eines auf 95 °C erhitzten Lithiumlaurylsulfat (LDS) Ladepuffers auf jede Säule aufgetragen und 5 min bei RT inkubiert, dann weitere 50  $\mu$ l des vorgewärmten LDS Puffers aufgetragen und der Durchlauf von ca. 45  $\mu$ l in einem Eppendorfgesäß aufgefangen. Schließlich wurden den 45  $\mu$ l Lysat 14,4  $\mu$ l *NuPAGE<sup>TM</sup> Sample Buffer (4x)* zugesetzt und die Co-IP-Probe kurz bei 95 °C verkocht. Die Proteine wurden durch eine Gelelektrophorese in einem *NuPAGE<sup>TM</sup> Bis-Tris Midi Gel 4-12%* bei 200 V für 90 min getrennt, hierzu wurden 10-15  $\mu$ l der Co-IP-Probe aufgetragen. Im nächsten Schritt wurden die Proteine im Halbtrockenverfahren in einer Dunkelkammer 75 min auf eine Nitrocellulosemembran geblotet und für eine Nacht in 5% Milch mit 0,1% TBS-Tween und 0,1% BSA geblockt. Die geblockten Membranen wurden dann für 1 h mit dem ersten Antikörper (je nach transfiziertem Marker) in 5% Milch bei RT inkubiert, dann 3-5 min mit TBS-Tween gewaschen, mit dem HRP-konjugierten zweiten Antikörper für wiederum 1 h in 10% Milch inkubiert und noch einmal 3-5 min in TBS-Tween gewaschen. Die Blots wurden visualisiert mit *SuperSignal West Femto Substrate*, aufgenommen mit einem DIANA III Bildgebungssystem und korrigiert und quantifiziert mittels *Aida Image Analyse Software v.4.04*.

### 2.2.12 In-Cell/On-Cell ELISA

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein antikörperbasierter Immunassay. Über die Bindung an einen Ziel-spezifischen Antikörpers wird die Zielstruktur (hier ein Protein) an eine Oberfläche gebunden. In einem nächsten Schritt bindet ein sekundärer Antikörper an den primären Antikörper. Dieser sekundäre Antikörper ermöglicht, beispielsweise durch die Kopplung mit der Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP), eine enzymatische Quantifizierung der Proteinmenge über ein Farbstoffsubstrat (Engvall u. a. 1971, van Weemen u. a. 1971). Über die Durchführung des Immunassays mit permeabilisierten und unpermeabilisierten Zellen kann ein Verhältnis von Oberflächen- zu Gesamtexpression eines Proteins ermittelt werden (Bishop u. a. 1992, Lourenco u. a. 2010). Die *On-Cell/In-Cell* ELISA Experimente wurden mit transient transfizierten HEK-293 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben transfiziert, allerdings wurden pro *well* 400.000 Zellen und 0,6  $\mu$ g DNA verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen in DMEM resuspendiert, aus einem *well* der Nukleofektionsplatte wurden zweimal je 45  $\mu$ l entnommen und auf zwei *wells* einer 96-*well* Zellkulturplatte mit klarem und flachem Boden aufgeteilt, um für den *In-Cell* und den *On-Cell* ELISA jeweils Zellen der gleichen Transfektionsreaktion zu nutzen. Die Zellen wurden für 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, dann zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen, mit 100  $\mu$ l 3,7% Formaldehyd in PBS für 15 min fixiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Während die *On-Cell* ELISA Proben so belassen wurden, wurden die *In-Cell* ELISA Proben zusätzlich wie folgt behandelt: die Zellen wurden mit 100  $\mu$ l/*well* 0,1% Triton X100 in PBS für 15 min permeabilisiert,

mit PBS gewaschen, mit 100  $\mu$ l Quenching-Lösung für 20 min versetzt und nochmals mit PBS gewaschen. Dann wurden sowohl die *In-Cell* als auch *On-cell* ELISA Proben gemeinsam verarbeitet, indem zunächst unspezifische Antikörperbindungen mit 100  $\mu$ l 1% BSA in PBS pro *well* für 30 min geblockt, danach die Proben mit dem primären Antikörper versetzt (100  $\mu$ l Maus Anti-hRluc 1:10.000 in 1% BSA in PBS) und für 10-12 h inkubiert wurden. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit 100  $\mu$ l TBS-Tween wurde der sekundäre Antikörper (100  $\mu$ l Anti-Maus HRP-konjugiert, 1:5.000 in TBS-Tween) für 30 min hinzugegeben, danach 3-mal mit TBS-Tween gewaschen, bevor 100  $\mu$ l des TMB Substrats für 10 min zugegeben wurden. Nach Zugabe der TMB *Stop Solution* wurde 15 min später bei 450 nm die Absorption gemessen. Mit destilliertem Wasser wurde die TMB *Stop Solution* ausgewaschen und dann 100  $\mu$ l *Janus Green* für 5 min zugegeben. *Janus Green* als Azofarbstoff dient über Mitochondrienanfärbung der Quantifizierung der Zellzahl (Cooperstein u. a. 1953) und damit der Standardisierung der Zellmengen zwischen den Bedingungen. Schließlich wurde mit Wasser gewaschen, für 10 min 100  $\mu$ l Elutionspuffer zugegeben und abschließend bei 615 nm nochmals die Absorption gemessen. Als Kontrollen wurden gleichartig behandelte nicht-transfizierte Zellen mitgezogen und außerdem sowohl nicht-transfizierte als auch transfizierte Zellen nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert.

### 2.2.13 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der *GraphPad Prism 5* Software. Signifikanz (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) wurde mit einfachen ANOVAs mit Bonferroni-Korrektur bestimmt.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Die Erweiterung des ORMDL-Interaktoms

Zum Zeitpunkt der Entdeckung des Zusammenhangs von kindlichem Asthma und einem SNP in der Promotorregion von ORMDL3 (Moffatt u. a. 2007) waren die zellulären Funktionen von ORMDL3 noch unklar, keine funktionellen Domänen in ORMDL3 bekannt und nur eine einzige PPI für ORMDL3 identifiziert worden. Die Analyse von PPI kann jedoch von zentraler Bedeutung für das Verständnis zellulärer Prozesse sein, da eine Vielzahl von Proteinen ihre Funktionen innerhalb größerer Proteinkomplexe ausüben und die Mehrzahl aller Proteine ihre Funktionen nur durch das Zusammenwirken mit anderen Proteinen ausführen können. Proteine, deren Funktionen bisher unbekannt sind, können über den Nachweis von Interaktionen mit anderen Proteinen, deren Funktionen wiederum bekannt sind, möglichen Signalprozessen, Stoffwechselwegen, subzellulären Funktionen und Erkrankungen zugeordnet werden (Vidal 2016). Entsprechend der *disease module hypothesis* (Barabási u. a. 2011, Menche u. a. 2015) ist zudem eine Häufung von Proteinen, die für eine Erkrankung relevant sind, innerhalb einer gemeinsamen Unterregion des Interaktoms zu erwarten. Daher erfolgte im ersten Teil dieser Arbeit die Erweiterung des humanen ORMDL-Interaktoms.

#### 3.1.1 Literaturrecherche zum ORM-Interaktom

Ein erster Schritt in der Untersuchung der PPI von ORMDL war die Übertragung von bekannten Interaktionen aus dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* auf den Menschen. Dazu wurden zunächst biologische Datenbanken für PPI durchsucht. Im Mai 2009 waren in den Datenbanken BIOGRID (Stark u. a. 2006), STRING (Szklarczyk u. a. 2015), MIPS (Mewes u. a. 2011) und BIND (Bader 2003) insgesamt 43 PPI für ORM1 und ORM2 bekannt, dazu kamen noch 153 genetische Interaktionen. Aus dem *Homo sapiens* Interaktom war zu diesem Zeitpunkt für ORMDL3 eine einzige Interaktion mit dem Protein EEF1A1 bekannt. Für ORMDL1 und ORMDL2 fanden sich keine bekannten Interaktionspartner. Zu diesen 43 bekannten Interaktionspartnern in *Saccharomyces cerevisiae*

wurden in den Datenbanken Homologene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>) und ensembl (Aken u. a. 2016) über ihren BLAST-Score (Altschul u. a. 1990) die entsprechenden menschlichen Homologe identifiziert. Für ATG1, CCW12, DFG5, ISC1, EMC5, PEX29, PHO88, PTK2, MSC7, NDC1, SHR3, SLT2, SOP4, SPC1, SPC2, SSH1, SUR2, SWP1, TOS3, UIP3, USA1, VHS3, PKP2 und YNL190W konnten keine humanen Homologe gefunden werden. Es ließen sich somit neben den ORMDL-Proteinen nur für 17 weitere der 42 Interaktionspartner homologe Gene identifizieren.

ORM-Interaktionspartner	Homologes humanes Gen	BLAST-Score
ERG11	CYP51A1	315
ERG25	MSMO1	190
ERG26	NSDHL	216
ORM2	ORMDL3	83
SMT3	SUMO1	86
WBP1	DDOST	116
YCK1	CSNK1G2	348

**Tabelle 3.1:** ORMDL Interaktom: Humane Homologe mit BLAST-Score der ORM-Interaktionspartner in *Saccharomyces cerevisiae*

Unter den 17 identifizierten homologen Proteinen fanden sich vierzehn Membranproteine, darunter sieben *single-pass* und vier *multi-pass* Membranproteine. 11 dieser Membranproteine sind in der ER-Membran lokalisiert. 6 Proteine sind an der Fettsäure- und Cholesterinbiosynthese beteiligt, 6 weitere Proteine am intrazellulären Vesikeltrafficking, 2 an der Regulation der ER-Stressreaktion und 2 an der Modifizierung von GPCR-Signalkaskade und dem GPCR-Trafficking. TMED10 ist zudem Teil des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes.

Von den 17 identifizierten Homologen waren nur 6 bei öffentlich zugänglichen cDNA-Repositorien wie beispielsweise PlasmID oder MGC erhältlich. Hierbei handelte es sich um DDOST, NSDHL, MSMO1, CYP51A1, CSNK1G2 und SUMO1 (Tabelle 3.1). Die drei menschlichen Homologe der ORM-Proteinfamilie ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3, waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die entsprechenden Gene wurden bei PlasmID bestellt und in Gateway-Vektoren kloniert, um sie einer Untersuchung mittels BRET zugänglich zu machen. Parallel zum Verlauf der im Folgenden dargestellten Experimente hat sich das bekannte ORM-Interaktom beträchtlich erweitert, für ORM1 sind nun 19, für ORM2 schon 61 PPI bekannt, sowie 327 genetische Interaktionen für ORM2 und 47 genetische Interaktionen für ORM1 (Stand Februar 2017, BIOGRID). In *Homo sapiens* ist die Zahl an bekannten Interaktionen allerdings weiterhin begrenzt, hier finden sich nun 6 (APP, EEF1A1, ELAVL1, LNX1, SPTLC1, TCTN3) beschriebene PPI für ORMDL3, 2 (APP, CREB3) für ORMDL1 und 3 (GPR183,

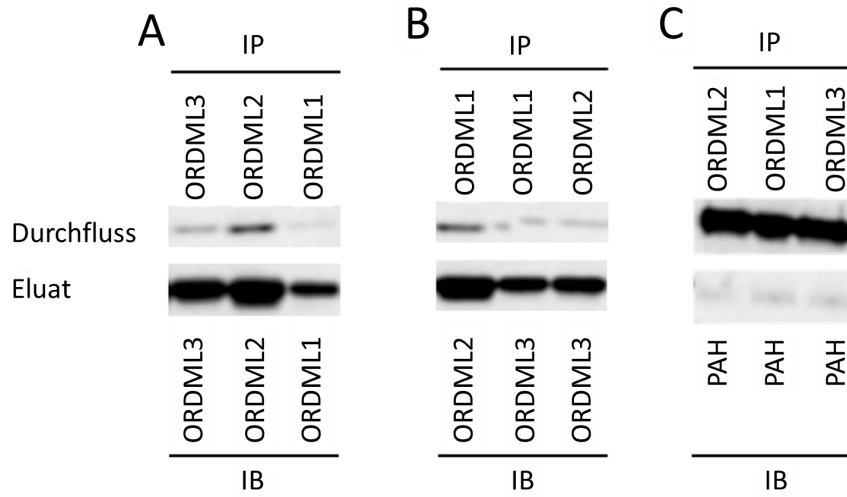
SLC39A4, TCTN3) für ORMDL2. Genetische Interaktionen sind für *ORMDL* bisher nicht beschrieben worden.

### 3.1.2 Nachweis der Homo- und Heterooligomerisierung von ORMDL mittels Koimmunpräzipitation

Da in *Saccharomyces cerevisiae* bereits eine Interaktion zwischen den ORMDL-Homologen ORM1 und ORM2 bekannt war, wurde zunächst die Homo- und Heterooligomerisierung der 3 humanen ORMDL-Proteine untersucht. Auch ließen die gemeinsame subzelluläre Lokalisation in der Endoplasmatisches Reticulum (ER)-Membran, die große Sequenzhomologie von 80 % bis 84 % (Hjelmqvist u. a. 2002) zwischen ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 und die möglichen ähnlichen Funktionen der drei Proteine (Hjelmqvist u. a. 2002) eine Homo- bzw. Heterooligomerisierung im ER möglich erscheinen. Zur Untersuchung der PPI diente die Methode der Co-IP. Jeweils 6 Millionen kotransfizierte COS-7-Zellen pro Kombination wurden verwendet. Untersucht wurden die Fusionskonstrukte ORMDL1-HA mit ORMDL1-V5, ORMDL2-HA mit ORMDL2-V5, ORMDL3-HA mit ORMDL3-V5, ORMDL1-HA mit ORMDL2-V5, ORMDL1-HA mit ORMDL3-V5 und ORMDL2-HA mit ORMDL3-V5 sowie die folgenden Kombinationen zur Kontrolle: ORMDL2-HA mit PAH-V5, ORMDL1-HA mit PAH-V5 und ORMDL3-HA mit PAH-V5. Für die Immunpräzipitation wurden der Ratten-Anti-HA-IgG Antikörper (Verdünnung 1:48) und  $\mu$ Mac Beads (Verdünnung 1:7) verwendet. Zur Detektion wurden als primärer Antikörper Maus-Anti-V5-IgG (Verdünnung 1:5000) und als sekundärer Antikörper Ziegen-Anti-Maus-IgG-HRP (Verdünnung 1:10000) verwendet (Abschnitt 2.2.11). Mittels Co-IP ließ sich zeigen, dass alle ORMDL-Proteine Oligomere bilden. Abbildung 3.1 zeigt in Teil A die Homooligomerisierung und in Teil B die Heterooligomerisierung für alle Kombinationsmöglichkeiten von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3. Es fand sich jeweils eine kräftige Bande im Eluat. Die schwachen Banden im Durchfluss erklären sich durch die Präzipitation der ORMDL-Proteine an den Beads, wodurch ORMDL nur zu einem geringen Anteil in den folgenden Waschschritten in den Überstand überging. Es lässt sich hieraus ableiten, dass alle ORMDL-Proteine miteinander in der Form von Homo- und Heterooligomeren interagieren. Abbildung 3.1 Teil C zeigt die zugleich durchgeführten Kontrollbedingungen des Experiments. Bei fehlender Interaktion mit der Negativkontrolle Phenylalaninhydroxylase (PAH) war ORMDL nur im Durchfluss nachweisbar und nicht im Eluat. Somit war ORMDL nicht durch PAH präzipitiert worden und es ergab sich, wie erwartet, weder ein Anhalt für eine Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 oder ORMDL3 mit PAH noch ein Hinweis auf eine falsch-positive Reaktion.

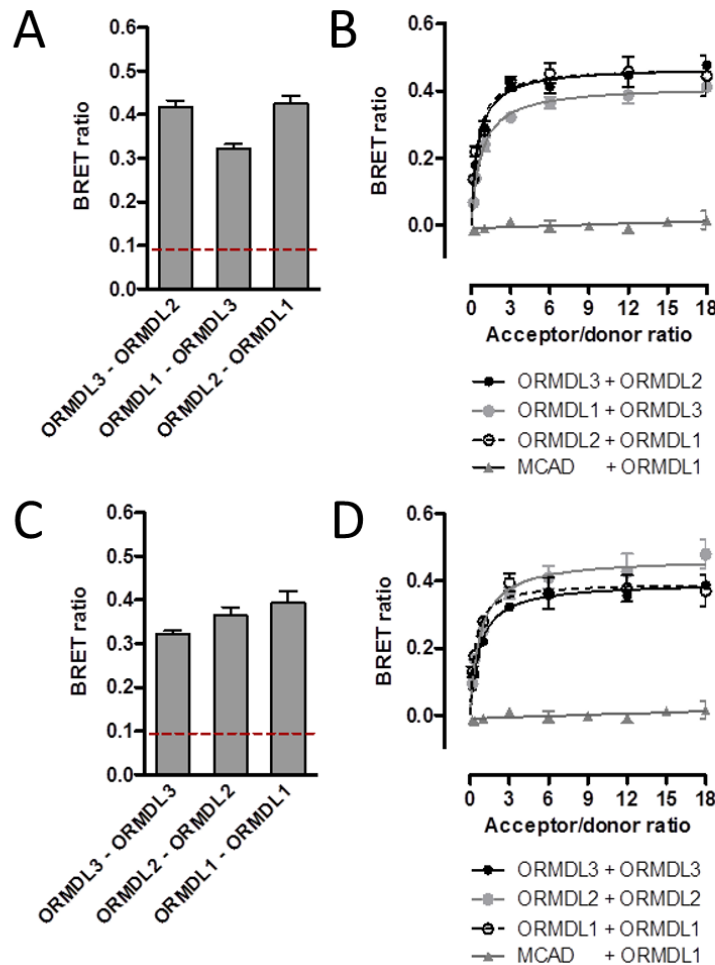
### 3.1.3 Bestätigung der Homo- und Heterooligomerisierung von ORMDL mittels BRET

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus der Co-IP wurden nachfolgend BRET-Experimente durchgeführt (Abschnitt 2.2.10), und zwar als Interaktionsexperimente und Sät-



**Abbildung 3.1:** Co-IP der (A) Homooligomerisierung und (B) Heterooligomerisierung der ORMDL-Proteine sowie der Kontrollbedingung mit PAH (C). Es wurden ORMDL-Proteine, die ein C-terminales HA-Tag bzw. ein V5-Tag tragen, präzipitiert mit einem Anti-HA-Antikörper (IP) und detektiert mit einem Anti-V5-Antikörper (IB). Darstellung der nachweisbaren Banden im Eluat für (A) eine Homooligomerisierung von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 und (B) eine Heterooligomerisierung von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 sowie der nachweisbaren Banden im Durchfluss für (C) PAH mit ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3.

tigungsexperimente in COS-7-Zellen. Für die Interaktionsexperimente wurden alle 8 möglichen Tag-Kombinationen getestet, um die PPI zu bestätigen. In den Sättigungsexperimenten, die in der Tag-Kombination durchgeführt wurden, die zuvor in den Interaktionsexperimenten die höchste BRET-Ratio gezeigt hatte, kann hingegen die Qualität einer möglichen PPI beurteilt werden. Gezeigt werden im Folgenden jeweils die Mittelwerte für vier unabhängige Experimente. In den Interaktionsexperimenten mit festem Akzeptor/Donor-Verhältnis von 1:3 lag die BRET-Ratio für alle Kombinationen an Homo- und Heterooligomerisierungen von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 über dem oberen Schwellenwert von 0,0915 und waren somit positiv. Die Sättigungsexperimente dienten darüber hinaus der genaueren Charakterisierung der Interaktionskinetik ( $BRET_{50}$ ,  $BRET_{max}$ ). Die  $BRET_{50}$  gibt das Akzeptor/Donor-Verhältnis an, bei dem die halbmaximale BRET-Ratio erreicht wird. Je niedriger sie ist, umso höher ist die relative Affinität der Proteine zueinander. Zur Kontrolle wurde eine in Interaktionsexperimenten als negativ bestimmte Interaktion mit MCAD verwendet, die in gleicher Weise mit ansteigendem Akzeptor/Donor-Verhältnis untersucht wurde. ORMDL1 zeigte eine zweifach höhere Affinität zur Homooligomerisierung, gekennzeichnet durch die niedrigere  $BRET_{50}$ , als ORMDL2 und ORMDL3 (Tabelle 3.2). Dieser Unterschied in der Homooligomerisierung war signifikant in einer einfachen ANOVA mit Bonferroni-Korrektur sowohl im Vergleich von ORMDL1 mit ORMDL2 als auch mit ORMDL3. Außerdem war die Affinität von ORMDL2/ORMDL3 und ORMDL2/ORMDL1 Heteroo-



**Abbildung 3.2:** Homomere Interaktionen jeweils zwischen ORMDL3, ORMDL2 und ORMDL1 analysiert durch (A) BRET-Interaktionsexperimente und (B) BRET-Sättigungsexperimente sowie heteromere Interaktionen jeweils zwischen ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 ebenfalls analysiert durch (C) BRET-Interaktionsexperimente und (D) BRET-Sättigungsexperimente. Fusionsproteine von ORMDL mit hRluc oder Venus wurden hierzu in COS-7-Zellen koexprimiert und die BRET-Ratio wurde durch Lumineszenzdetektion gemessen. Die rot-gestrichelte Linie zeigt den methodenspezifischen Schwellenwert von 0,0915 für eine positive Interaktion. In BRET Sättigungsexperimenten (B und D) wurde die Rate von ORMDL-Akzeptor-Fusionsprotein zu ORMDL-Donor-Fusionsprotein in den Kombinationen 3:1, 1:1, 1:3, 1:6, 1:12 und 1:18 variiert, was in der nonlinearen Regression zu einer hyperbolischen Sättigungskurve im Falle einer positiven Interaktion führt, während die Koexpression von ORMDL mit der mitochondrialen Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase (MCAD) als Negativkontrolle nur zu einer linearen Zunahme der BRET-Ratio führt als Hinweis auf eine fehlende Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Die Werte stellen jeweils den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus  $n=4$  Replikationen dar (Abbildung ist Teil der Publikation von Toncheva u. a. 2015).



ligomere zu bilden signifikant höher als für die jeweiligen Homooligomere von ORMDL 2 bzw. ORMDL3 (Tabelle 3.2). Zusammenfassend gelang der Nachweis von PPI zwischen ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 sowohl in der Homo- als auch in der Heterooligomerisierung mittels zwei verschiedener Methoden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Homo- und Heterooligomere mit unterschiedlichen Affinitäten bilden.

Akzeptor	Donor	BRET <sub>50</sub>
ORMDL3	ORMDL3	0.72 ± 0.05
ORMDL3	ORMDL2	0.52 ± 0.06
ORMDL3	ORMDL1	0.75 ± 0.10
ORMDL2	ORMDL2	0.74 ± 0.15
ORMDL2	ORMDL1	0.45 ± 0.09
ORMDL1	ORMDL1	0.36 ± 0.09

**Tabelle 3.2:** BRET<sub>50</sub> (Akzeptor/-Donor-Verhältnis bei halbmaximaler BRET-Ratio als relatives Maß für die Bindungsaffinität) der einzelnen ORMDL-Homo- und Heterooligomere in den BRET-Sättigungsexperimenten.

### 3.1.4 Übertragung auf humane Homologe der ORM-Interaktionspartner

Die in der Datenbankrecherche identifizierten humanen Homologe von ORM1- und ORM2-Interaktionspartnern in *Saccharomyces cerevisiae* wurden in BRET-Interaktionsexperimenten gegen ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 getestet. Dazu wurden COS-7 Zellen mit DDOST, NSDHL, MSMO1, CYP51A1, CSNK1G2 oder SUMO1 mit jeweils einem der ORMDL-Proteine kotransfiziert in allen möglichen BRET-Konstrukt-Tagkombinationen. Zudem wurde die einzige vorbeschriebene humane PPI zwischen ORMDL3 und EEF1A1 überprüft.

Insgesamt ließen sich 4 der 6 Interaktionen aus *Saccharomyces cerevisiae* mit humanen Homologen der ORM-Interaktionspartner bestätigen (Tabelle 3.3). Darunter waren alle ER-Membranproteine. Die einzige bekannte humane PPI von ORMDL3 mit EEF1A1 konnte hingegen nicht bestätigt werden, für alle Kombinationen lag die BRET-Ratio weit unter dem methodenspezifischen oberen Schwellenwert (UT) von 0,0915. Die beschriebene Interaktion stammt allerdings aus einer Hochdurchsatz-Studie aus dem Jahr 2005, die mittels *Yeast Two-hybrid*-System 3.186 Interaktionen zwischen 1.705 Proteinen identifizierte (Stelzl u. a. 2005). Es ist bekannt, dass sich die positiven Interaktionen aus großen *Yeast Two-hybrid*-Studien nur in circa 30 % der Fälle bestätigen lassen (Lemmens u. a. 2010). Für die gefundenen Interaktionspartner von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 sind folgende subzelluläre Verteilung und folgende Funktionen bekannt: DDOST ist

Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
PGLYRP1	0,057	0,013	0,017
DDOST	0,177	0,356	0,255
CSNK1G2	0,001	0,013	0,020
CYP51A1	0,220	0,348	0,207
EEF1A1	0,018	0,023	0,031
NSDHL	0,151	0,239	0,210
MSMO1	0,187	0,191	0,165
SUMO1	0,047	0,032	0,018

**Tabelle 3.3:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL mit den humanen Homologen der Interaktionspartner in *Saccharomyces cerevisiae*. Angegeben ist die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Grün: positive PPI (UT: 0,0915); Rot: negative PPI (LT: 0,0859).

ein ER-Membranprotein, das an der Übertragung mannosereicher Oligosaccharide auf neu synthetisierte Polypeptidketten im ER beteiligt ist. CYP51A1, MSMO1 und NSDHL sind ebenfalls ER-Membranproteine und sind an der Cholesterinbiosynthese beteiligt (Cunningham u. a. 2015, König u. a. 2000, Lewinska u. a. 2013, Li u. a. 1996).

### 3.1.5 Keine Erweiterung des Interaktoms über Gen-Gen-Interaktionen

In dem Datensatz der GWAS, die zur Entdeckung von ORMDL3 im Zusammenhang mit kindlichem Asthma führte, wurden auch Gen-Gen-Interaktionen des ORMDL3-SNP rs8076131 gesucht. Es ließen sich die beiden Kandidaten *MRO* und *VDR* identifizieren. Das *MRO*-Gen kodiert für ein nukleoläres Protein, das nur in männlichen Embryonen während der Differenzierung der Hoden transkribiert wird (Smith u. a. 2003). Das *VDR*-Gen hingegen codiert für den nukleären Vitamin D-Rezeptor, der neben dem Calciumstoffwechsel auch in die Regulation von Immunmechanismen (Lin u. a. 2008) involviert ist. Polymorphismen in diesem Gen werden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für so unterschiedliche Krankheiten wie Diabetes mellitus, Prostatakarzinom, multiple Sklerose oder morbid Adipositas in Verbindung gebracht (Pruitt u. a. 2014). Besonders interessant ist diese genetische Interaktion jedoch, da bereits eine Verbindung zwischen dem Vitamin D-Stoffwechsel und der Erkrankung an Asthma bronchiale postuliert wurde (z. B. Kerley u. a. 2015). Auch eine Vielzahl von Therapiestudien zur Supplementation von Vitamin D bei Asthmapatienten wurden bereits durchgeführt, ohne jedoch einen therapeutischen Effekt außerhalb der Prävention von Steroidnebenwirkungen im Knochenstoffwechsel zu zeigen (Kerley u. a. 2015). Wir führten daher BRET-Interaktionsexperimente mit diesen Proteinen in Fibroblasten-Nierenzelllinie der grünen Meerkatze (CV-1 (*simian*) in Origin, and carrying the SV40) (COS-7)-Zellen durch. Da alle BRET-

Ratios unterhalb des unteren Schwellenwerts (LT) von 0,0859 lagen, ließen sich keine Interaktion von MRO oder VDR mit ORMDL1, ORMDL2 oder ORMDL3 auf Proteinebene belegen (Tabelle 3.4).

Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
MRO	0,035	0,043	0,007
VDR	0,009	0,012	0,015

**Tabelle 3.4:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL mit anderen möglichen mit Asthma assoziierten Proteinen aus der GWAS. Angegeben ist die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Rot: negative PPI (LT: 0,0859).

### 3.1.6 Interaktion mit relevanten immunologischen Proteinen

Aufgrund der Assoziation zwischen ORMDL3 und kindlichem Asthma waren wir in einem nächsten Schritt an der Untersuchung von PPI zwischen ORMDL und relevanten immunologischen Proteinen interessiert. Es wurden die folgenden Proteine aufgrund von der bei Asthma bekannten Pathomechanismen ausgewählt: CCL11, CCR3, CCR4, CCR6, IL2RB, IL2RG, IL10RB, IL12RB1, IL17RA, IL21R, IL23R, RORC, STAT1, STAT3, STAT4, STAT5B und STAT6.

Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
CCL11	0,057	0,0919	0,055
CCR3	0,141	0,187	0,131
CCR4	0,152	0,173	0,139
CCR6	0,151	0,150	0,144
IL2RB	0,098	0,110	0,106
IL2RG	-0,005	0,032	0,027
IL10RB	0,185	0,122	0,103
IL12RB1	0,103	0,106	0,114
IL17RA	0,070	0,041	0,075
IL21R	0,038	0,041	0,036
IL23R	0,033	0,037	0,056
RORC	0,038	0,033	0,044

STAT1	0,028	0,029	0,039
STAT3	0,048	0,019	0,007
STAT4	0,053	0,041	0,047
STAT5B	0,049	0,025	0,025
STAT6	0,029	0,027	0,025

**Tabelle 3.5:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL mit immunologisch relevanten Proteinen. Angegeben ist die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Grün: positive PPI (UT: 0,0915); Rot: negative PPI (LT: 0,0859).

Die IL2-Rezeptoren (IL2RB -  $\beta$ -Kette; IL2RG -  $\gamma$ -Kette) sind bedeutsam in der T-Zell-vermittelten adaptiven Immunantwort. Über den IL2-Rezeptor wird die Balance zwischen Toleranz und Immunität reguliert (Malek u. a. 2010). Die IL2-Konzentration steuert sowohl die Differenzierung von CD8+ T-Zellen als auch von regulatorischen T-Zellen (Treg). Über die Treg hat IL2 Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen (Liao u. a. 2011) und somit ganz grundlegend auf Autoimmunität (Sharma u. a. 2011). Für einen Polymorphismus des *IL2RB*-Gens ist zudem eine Assoziation mit einem erhöhten Asthmarisiko berichtet worden (Padrón-Morales u. a. 2013, R.-S. Wang u. a. 2015). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die Immunantwort über IL2 in Asthmapatienten dysreguliert ist (Mat u. a. 2012). Die IL2-Rezeptoren vermitteln die Rezeptorantwort unter anderem über den Signalfpfad JAK-STAT (Pruitt u. a. 2014). Entsprechend untersucht wird auch die PPI zwischen ORMDL und STAT1, STAT3, STAT4, STAT5B und STAT6. Insbesondere STAT6 ist hinsichtlich der Asthmapathogenese relevant. Mehrere Polymorphismen des *STAT6*-Gens sind beschrieben, die das Risiko, an Asthma zu erkranken, erhöhen bzw. protektiv wirken (Godava u. a. 2013, Kabesch u. a. 2006, Qian u. a. 2014). Sogar eine Aktivierung von STAT6 über  $\beta_2$ -AR, die zu einer erhöhten bronchialen Reagibilität führt, ist bereits beschrieben worden (Knight u. a. 2015). Auch STAT3 wird eine regulatorische Funktion in der Auslösung von inflammatorischen Reaktionen der Lunge zugeschrieben (H. Gao u. a. 2007). Wir untersuchten auch die Interaktion mit dem IL-21-Rezeptor. IL-21 ist weitgehend homolog mit IL-2 (Gong u. a. 2013) und IL21R scheint ebenso wie IL2RB über die Vermittlung einer TH2-Immunantwort eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen zu spielen (Lajoie u. a. 2014). Ein Polymorphismus des für IL21R codierenden Gens soll zudem mit einem erhöhten Risiko, an Asthma zu erkranken, assoziiert sein (Chatterjee u. a. 2009). Chemokinligand 11 (CCL11) gehört zur Gruppe der Eotaxine und wird auch als Eotaxin-1 bezeichnet (Williams 2015, Pruitt u. a. 2014). Die CCL11-Sputumkonzentration ist als potenzieller Biomarker für die Diagnose und Verlaufsbeurteilung des Schweregrades von Asthma bronchiale vorgeschlagen worden (D. Wu u. a. 2014). CCL11 fungiert als Chemotaxin in der Rekrutierung von Eosinophilen, die den Chemokinrezeptor CCR3 tragen, in das Gewebe und ist somit

an allen eosinophilen allergischen Reaktionen beteiligt (Jose u. a. 1994, Ponath u. a. 1996). Therapeutika, die CCL11 und CCR3 beeinflussen, sind als mögliche Asthmamedikamente in der Erprobung (Catley u. a. 2011, Garcia u. a. 2005, Pease u. a. 2014, Wegmann 2011). Daher untersuchten wir auch die PPI zwischen ORMDL und den Eotaxin-Rezeptoren CCR3, CCR4 und CCR6. Weiterhin untersuchten wir den IL12-Rezeptor (IL-12 Rezeptor (IL12R)B1), da über IL-12 mit der Balance zwischen TH1- und TH2-Immunantwort einer der zentralen pathogenetischen Mechanismen der TH2-Autoimmunerkrankung Asthma reguliert wird (Barnes 2002, Holgate 2008, Leonard u. a. 2003, Wills-Karp 1998). Zudem untersuchten wir die Interaktion der ORMDL-Proteinfamilie mit dem IL-23 Rezeptor (IL-23 Rezeptor (IL23R)), der mit IL12RB1 einen Komplex bilden kann (Pruitt u. a. 2014). Außerdem untersuchten wir den IL-10 Rezeptor (Untereinheit IL-10 Rezeptor (IL10R)B). IL-10 hat eine Vielzahl von Effekten in der Immunregulation und Inflammation. Es wirkt beispielsweise der Ausbildung einer TH1-Immunantwort entgegen und erhöht die Antikörperproduktion von B-Zellen (Pruitt u. a. 2014). Signalkaskaden über den IL-10-Rezeptor werden aufgrund der Vielzahl der vermittelten Immunmechanismen mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, darunter auch Asthma bronchiale (Moreira u. a. 2011, Zdrenghea u. a. 2015, Zheng u. a. 2014). Dies gilt auch für den IL-17 Rezeptor (Untereinheit IL-17 Rezeptor (IL17R)A), der ebenfalls in der Asthmapathogenese involviert sein soll über Mechanismen wie Mukussekretion, Reaktivität der glatten Muskelzellen und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die abhängig sind von einer TH17 T-Helferzellaktivierung (Chesne u. a. 2014, Lindén u. a. 2014, Silverpil u. a. 2012, Y.-H. Wang u. a. 2011). Schließlich untersuchten wir die PPI mit RORC. Dieser DNA-bindende nukleäre Transkriptionsfaktor ist ebenfalls bedeutsam in der Differenzierung von TH17-Zellen sowie in der Thymopoese. Zwar führt ein Verlust der RORC-Funktion entsprechend einer aktuellen Publikation hauptsächlich zu einer schweren Immundefizienz gegen invasive Pilz- und Mykoplasmeninfektionen (Okada u. a. 2015), doch gibt es auch Hinweise auf einen Einfluss der Überexpression von *RAR related orphan receptor C* (RORC) auf die anhaltende Inflammation der Atemwege in Kindern mit Asthma (Hamzaoui u. a. 2011), in einem Mausmodell einer schweren allergischen Inflammation der Atemwege (Ano u. a. 2013) sowie einer durch RORC vermittelten Zunahme der TH17-Zellen in Asthmapatienten (Loubaki u. a. 2013). Wir führten diese PPI-Experimente wiederum als BRET-Interaktionsexperimente in COS-7-Zellen durch (Abschnitt 2.2.10). Von den 17 untersuchten immunologisch relevanten Proteinen interagierten 6 Membranproteine mit ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 (Tabelle 3.5). Es handelt sich um den ersten Nachweis einer Interaktion von ORMDL mit in der Ausbildung einer TH2-Immunantwort relevanten Rezeptoren wie IL2RB, IL12RB1 und IL10RB sowie mit den in der Chemotaxie von eosinophilen Granulozyten relevanten Rezeptoren CCR3, CCR4 und CCR6. Das Eotaxin CCL11 hingegen als intra- und extrazelluläres plasmatisches Protein interagierte nur mit ORMDL2.

### 3.1.7 Interaktion mit Membranproteinen

Bei der Untersuchung der PPI von ORMDL mit immunologisch relevanten Proteinen zeigten sich positive Interaktionen mit den sechs Membranrezeptoren IL2RB, IL10RB, IL12RB1, CCR3, CCR4 und CCR6, während sich mit den in der Signaltransduktion involvierten STAT-Proteinen keine positiven Interaktionen nachweisen ließen. Hieraus ergab sich die Frage, ob ORMDL möglicherweise insbesondere mit Membranproteinen interagiert. Um diese Hypothese zu prüfen, wählten wir sowohl weitere Asthma-relevante Membranproteine als auch Membranproteine aus der Klasse GPCR als Vertreter der wichtigsten Klasse von Rezeptoren im menschlichen Organismus: ADORA3, ADORA2B, B2AR, CD2, CD86, CHRM3, CYSLTR1, CXADR, CXCR1, CXCR2, CXCR4, PAR2 und OPRD1. Der Adenosin A3 Rezeptor (ADORA3), der Adenosin A2b Rezeptor (ADORA2B), der Adrenorezeptor  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -AR), der muskarinische Acetylcholinrezeptor 3 (CHRM3) und der Cysteinyl-Leukotrienrezeptor 1 (CYSLTR1) wurden aufgrund ihrer Relevanz in der Therapie und Diagnostik von Asthma bronchiale und aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur Klasse GPCR ausgewählt. Sowohl über Adenosin als auch über Acetylcholin kann die Kontraktion von glatter Muskulatur beispielsweise in den Bronchien vermittelt werden (Leuppi 2014). Über CYSLTR1 wirkt das Medikament Montelukast aus der Gruppe der Leukotrienrezeptor-Antagonisten (Bush 2015, Reiss u. a. 1996, Sorkness 1997, H. P. Zhang u. a. 2014). Über  $\beta_2$ -AR wirken mit den kurz- und langwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika die wichtigsten Medikamente in der Therapie von Asthma bronchiale. Weiterhin wurden die in der cDNA-Bank der Arbeitsgruppe verfügbaren GPCR Chemokin-(C-X-C Motiv)-Rezeptor 1 (CXCR1), Chemokin-(C-X-C Motiv)-Rezeptor 2 (CXCR2), Chemokin-(C-X-C Motiv)-Rezeptor 4 (CXCR4), Koagulationsfaktor II (Thrombin)-Rezeptor-ähnlich 1 (PAR2) und Opioidrezeptor  $\delta$ -1(OPRD1) untersucht sowie die verfügbaren Typ-I-Transmembranproteine Cluster of differentiation 2 (CD2), Cluster of differentiation 86 (CD86) und Coxsackie-Virus-und-Adenovirus-Rezeptor (CXADR) (Pruitt u. a. 2014). Die PPI-Experimente führten wir erneut als BRET-Interaktionsexperimente in COS-7-Zellen durch.

Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
ADORA3	0,127	0,111	0,104
ADORA2B	0,195	0,188	0,162
B2AR	0,243	0,435	0,302
CD2	0,028	0,039	0,020
CD86	0,278	0,323	0,153
CHRM3	0,178	0,212	0,175
CXADR	0,170	0,220	0,138
CXCR1	0,217	0,311	0,300

CXCR2	0,109	0,288	0,329
CXCR4	0,080	0,049	0,041
CYSLTR1	0,147	0,120	0,167
OPRD1	0,183	0,258	0,248
PAR2	0,206	0,282	0,207

**Tabelle 3.6:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL mit GPCR und anderen Membranproteinen. Angegeben ist jeweils die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Grün: positive PPI (UT: 0,0915); Rot: negative PPI (LT: 0,0859).

Von den 13 untersuchten Membranproteinen interagierten 11 mit ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 (Tabelle 3.6). Darunter befinden sich alle getesteten für die Asthmatherapie relevanten Rezeptoren (ADORA2B, ADORA3, B2AR, CHRM3, CYSLTR1), aber auch GPCR, die in keiner Weise mit der Asthmapathogenese assoziiert sind (CD86, CXADR, CXCR1, CXCR2, OPRD1, PAR2). Keine Interaktion ließ sich zwischen ORMDL1, ORMDL2 oder ORMDL3 und CD2 oder CXCR4 nachweisen.

### 3.1.8 Interaktion mit molekularen Chaperonen

Aus den gezeigten Interaktion von ORMDL mit zahlreichen Membranproteinen, der Interaktion von ORM in *Saccharomyces cerevisiae* mit Proteinen des intrazellulären Vesikeltraffickings und Chaperonen, der erhöhten Sensibilität von ORM-*Double-knock-out*-Zelllinien auf zahlreiche Zellgifte (Hjelmqvist u. a. 2002), der Lokalisation von ORM-ähnliches Protein (*ORM-like protein*) (ORMDL) im ER und der weitgehenden Homologie der ORMDL-Proteine, die zudem Homo- und Heterooligomere bilden und dieselben Interaktionspartner haben, leiteten wir die Hypothese ab, dass die ORMDL-Proteine als Chaperone im ER funktionieren und die Faltung von Membranproteinen, die aus dem ER an die Zelloberfläche gelangen, beeinflussen könnten. Daher testeten wir die Interaktion der ORMDL-Proteine mit bekannten Chaperonen. Wir führten diese BRET-Interaktionsexperimente wiederum in COS-7-Zellen durch. Als mögliche Interaktionspartner aus der Gruppe der Chaperone wurden folgende Proteine getestet: CALR, CANX, FKBP1A, GOSR2, HSPA5, HSPA9B, HSPD1, HSP90AB1, DNAJB9, DNAJB11, KDEL2, KDEL2, LMAN2, MFN2, PDIA3, PTCH1, SEC22B, SEC61A1, SERP1, SIGMAR1, SIL1, SSR1, S100A8, TRAPPC2, VDAC1, XBP1 und ZDHHC3. Diese Proteine wurden ausgewählt, um den gesamten Prozess von der Proteinsynthese über die Korrektur von Fehlfaltung bis hin zur proteasomalen Degradation abzubilden. Zudem wurden Proteine mit einbezogen, die an der UPR beteiligt sind sowie am Prozess der Apoptose bei nicht erfolgreich verlaufender UPR. Die folgenden Funktionen sind für die einzelnen Proteine bekannt:

Calnexin (CANX) ist ein Mitglied der Calnexin-Chaperonen-Familie. Dieses Calcium-bindende ER-Protein interagiert mit neu synthetisierten Glycoproteinen und spielt eine zentrale Rolle in der Qualitätskontrolle der Proteinsynthese. Inkorrekt gefaltete Proteine werden durch die Bindung an Calnexin im ER zurückgehalten und der Degradation zugeführt (Hetz u. a. 2011). Calreticulin (CALR) ist ebenfalls ein Calcium-bindendes Protein mit Chaperonfunktion, das sich im Lumen von ER und Nukleus befindet (Gelebart u. a. 2005). Das durch das Gen *PDIA3* codierte Protein Protein-Disulfidisomerase Familie A Mitglied 3 interagiert mit Calreticulin und Calnexin in der posttranslationalen Modifikation von Glycoproteinen und unterstützt die Proteinfaltung durch die Ausbildung von Disulfidbrücken in den Glycoproteinsubstraten (Hetz u. a. 2011). Die Hitzeschockproteine HSPA5, HSPA9B, HSPD1 und HSP90AB1 fungieren ebenfalls als Chaperone der Proteinfaltung im ER. Sie werden als Antwort auf Zellstress vermehrt exprimiert um die Zelle vor fehlgefalteten oder defekten Proteinen zu schützen, indem sie die korrekte Faltung unterstützen und zugleich dauerhaft fehlgefaltete Proteine dem proteasomalen Abbau zuführen (Schlesinger 1990). Sie haben damit einen bedeutenden Anteil an der UPR (Bernales u. a. 2006). Die Mitglieder der DnaJ-Proteinfamilie DNAJB9 und DNAJB11 codieren auch für ER-Proteine, die als akkzessorische Proteine die ATPase-Aktivität von Hitzeschockproteinen regulieren und somit ebenfalls an der UPR teilhaben. Das *SIL1*-Gen codiert ein Protein, das in der ER-Membran lokalisiert ist und als Nukleotid-Austausch-Faktor des wichtigen Chaperons HSPA5 fungiert (Tyson u. a. 2000). Das X-Box-bindende Protein 1 (XBP1) codiert für einen Transkriptionsfaktor dessen mRNA auf die Anhäufung von ungefalteten Proteinen im ER hin durch (IRE1) in eine aktive Form (XPB1s) gespliced wird und die verstärkte Transkription von ER-Chaperonen auslöst (Brown u. a. 2012, Hetz u. a. 2011). Das Stress-assoziierte endoplasmatische Retikulumprotein 1 (SERP1) fungiert als eine Art „Rettungseinheit“ in Situationen von zellulärem Stress, indem es neu synthetisierte Membranproteine stabilisiert und vor der Degradation innerhalb der UPR schützt (Yamaguchi u. a. 1999). Führt die UPR als Reaktion auf zellulären Stress nicht zur Wiedererlangung einer zellulären Homöostase, so kann die Apoptose eingeleitet werden, um den Organismus vor einem weiteren Schaden durch eine dysfunktionale Zelle zu schützen. Das Gen *MFN2* codiert für das mitochondriale Membranprotein Mitofusin 2, das im Falle der Apoptose herabreguliert wird, was zu einer zunehmenden Fraktionierung der Mitochondrien und damit zur Einleitung des programmierten Zelltods führt (Youle u. a. 2012). Das spannungsabhängige Anionenkanalprotein 1 (VDAC1) fungiert als plasmamembranständiger Rezeptor in der Auslösung der zellulären Apoptose (Li u. a. 2014). Das S100 Calcium-bindende Protein A8 (S100A8) ist im Zytoplasma und Nukleus lokalisiert und löst bei hoher Konzentration die Apoptose aus (Ghavami u. a. 2010). Am korrekten Trafficking von neu gebildeten Proteinen vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran oder in den Extrazellulärraum haben die folgenden Proteine Anteil: Das Protein Sec61 Translocon  $\alpha$  1 Untereinheit (SEC61A1) dient der Insertion von Membranproteinen oder sekretorischen Proteinen in das ER und bindet in dieser Funktion eng an ER-membrangebundene Ribosomen (Lang u. a. 2012). Der endoplasmatische Membranrezeptor Signal Sequenz Rezeptor 1 (SSR1) fungiert ebenfalls als Translokator für neugebildete Proteine in das ER



(Hartmann u. a. 1994). Das Zinkfinger-(DHHC-Typ)-enthaltende Protein 3 (ZDHHC3) fungiert als ER-Membranprotein mit Palmitoyltransferaseaktivität. Als Palmitoylierung wird die Übertragung von Palmitinsäure auf Cysteinreste von Proteinen bezeichnet. Dies dient der besseren Lipidverankerung von Membranproteinen (Bijlmakers u. a. 2003) und damit in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen der korrekten Proteinfaltung sowie dem Trafficking von neugebildeten Proteinen (Ohno u. a. 2012). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Funktion von ORM in *Saccharomyces cerevisiae* und der Regulation von Sphingolipidbiosynthese und Palmitoylierung ist mittlerweile bekannt und wurde in der Einleitung unter 1.2 dargestellt (Breslow u. a. 2010, S. Han u. a. 2010). Das Typ-I-Transmembranprotein LMAN2 bindet an mannosereiche Glycoproteine und kontrolliert deren Sortierung und Qualitätskontrolle (Reiterer u. a. 2010). Auch GOS2R kodiert für ein Membranprotein, das am Trafficking neu gebildeter Proteine vom ER zum trans-Golgi-Apparat teil hat (Lowe u. a. 1997). Das Membranprotein SEC22 Homolog B (SEC22B) gehört zur Proteinfamilie der Vesikel-Trafficking-Proteine und ist beteiligt am Vesikeltransport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat (Hay u. a. 1997). Das FK506-bindende Protein 1A (FKBP1A) ist Teil der Immunophilinproteinfamilie und ebenfalls am Trafficking vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt (DiLella 1991). Es handelt sich bei den Immunophilinen aber zudem um Enzyme, und zwar um Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen, die mit der Bildung von Amid-Bindungen einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Proteinfaltung katalysieren. Somit fungiert FKBP1A auch als Chaperon (Schmidpeter u. a. 2015). Das Protein Trafficking Protein Partikel Komplex 2 (TRAPPC2) ist Teil eines höheroligomeren Komplexes, der das Anbinden und die Fusion von ER-Vesikeln an den Golgi-Apparat kontrolliert (Gavin u. a. 2002). Die KDEL-(Lys-Asp-Glu-Leu)-ER-Protein-Retentions-Rezeptoren (KDEL2 und KDEL3) haben eine gänzlich anders geartete Funktion in der Prozessierung von Proteinen im ER und Golgi-Apparat. Sie fungieren als Anker für ER-Proteine, indem sie an das Retentionsmotiv KDEL-(Lys-Asp-Glu-Leu) binden und so kontinuierlich ER-Proteine für den Rücktransport aus dem cis-Golgi-Netzwerk markieren (Pelham 1996).

Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
CALR	0,137	0,137	0,103
CANX	0,339	0,376	0,322
FKBP1A	0,118	0,076	0,122
GOSR2	0,220	0,204	0,216
HSPA5	0,063	0,007	0,022
HSPA9B	0,045	0,028	0,037
HSPD1	0,035	0,016	0,049
HSP90AB1	0,009	0,041	0,033

DNAJB9	0,030	0,017	0,046
DNAJB11	0,023	0,015	0,010
KDEL2	0,349	0,203	0,194
KDEL3	0,285	0,386	0,224
LMAN2	0,254	0,252	0,227
MFN2	0,076	0,035	0,051
PDIA3	0,079	0,047	0,059
PTCH1	0,250	0,248	0,226
SEC22B	0,324	0,308	0,276
SEC61A1	0,205	0,265	0,245
SERP1	0,442	0,608	0,376
SIGMAR1	0,278	0,326	0,271
SIL1	0,274	0,284	0,217
SSR1	0,238	0,148	0,142
S100A8	0,198	0,164	0,184
TRAPPC2	0,039	0,027	0,026
VDAC1	0,057	0,043	0,021
XBP1	0,004	-0,005	0,014
ZDHHC3	0,131	0,151	0,149

**Tabelle 3.7:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL mit Chaperonproteinen. Angegeben ist jeweils die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Grün: positive PPI (UT: 0,0915); Rot: negative PPI (LT: 0,0859).

Es waren 16 der 26 untersuchten Interaktionen zwischen Chaperonen und ORMDL-Proteinen positiv (Tabelle 3.7). Darunter fanden sich zahlreiche Interaktionen mit relevanten Proteinen aus den Prozessen der Proteinfaltung (CALR, CANX, SERP1, SIL1, SSR1), der posttranslationalen Modifikation (LMAN2, ZDHHC3) sowie des Traffickings (GOSR2, KDEL2, KDEL3, SEC22B, SEC61A1). Mit den wichtigen ER-luminalen Chaperonen aus der Gruppe der Hitze-Schock-Proteine (HSPA5, HSP90AB, HSPA9B, HSPD1) und ihren akzessorischen DnaJ-Proteinen (DNAJB9, DNAJB11) fanden sich hingegen keine Interaktionen, ebenso wie mit den mitochondrialen apoptoserelevanten Proteinen (MFN2, VDAC1). Unter den getesteten apoptoserelevanten Proteinen interagiert ORMDL nur mit Protein S100A8. Es handelt sich bei S100A8 jedoch zugleich um ein Calcium-bindendes Protein.

### 3.1.9 Interaktion mit Proteinen des $\gamma$ -Sekretase-Komplexes

Zum Zeitpunkt der Entdeckung von ORMDL3 als mögliches asthmarelevantes Protein (Moffatt u. a. 2007) war nur in einer Arbeit (Araki u. a. 2007) eine mögliche ORMDL-Funktion untersucht worden. Es wurden Mutationen im *PSEN1*-Gen identifiziert, die zu einer deutlich verminderten Expression von ORM-ähnliches Protein 1 (ORMDL1) (in dieser Publikation mit Adoplin-1 benannt) führen. PSEN1 ist Teil des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes, der außerdem aus Nicastrin, APH1 und PEN2 besteht und für die intramembranöse Spaltung von Amyloid-Vorläuferprotein (*Amyloid precursor protein*) (APP) und weiteren Typ-1-Membranproteinen zuständig ist. Somit könnte ORMDL unter der transkriptionellen Kontrolle von PSEN1 stehen und die Funktion des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes beeinflussen, also eine Rolle bei der Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ spielen (Araki u. a. 2007). In einer Co-IP wurden in dieser Publikation auch die PPI zwischen ORMDL1 und PSEN1 sowie Nicastrin untersucht, es waren allerdings keine Interaktionen nachweisbar, auch wenn die Daten der Co-IP in der Publikation nicht im Detail gezeigt wurden. Wir untersuchten daher die Interaktion der ORMDL-Proteinfamilie mit den Proteinen des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes. Wir führten diese BRET-Interaktionsexperimente in COS-7-Zellen durch. Tatsächlich waren 6 der 7 untersuchten

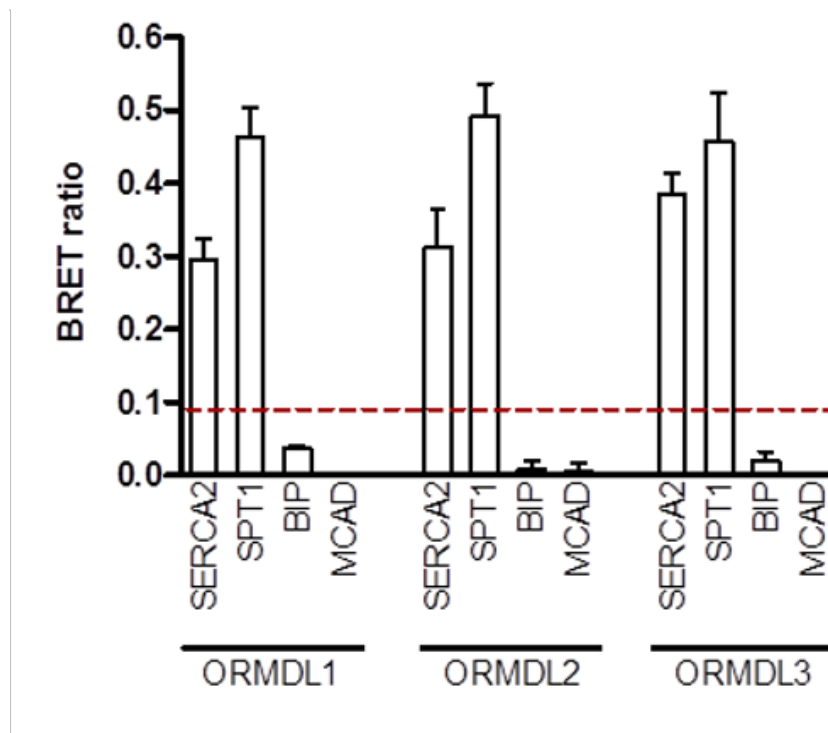
Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
APP	0,314	0,190	0,157
APH1A	0,124	0,198	0,267
APH1B	0,136	0,209	0,142
NCSTN	0,040	0,029	0,034
PSEN1	0,226	0,302	0,326
PSEN2	0,252	0,233	0,305
PSENEN	0,592	0,681	0,672

**Tabelle 3.8:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL und Proteinen des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes. Angegeben ist jeweils die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Grün: positive PPI (UT: 0,0915); Rot: negative PPI (LT: 0,0859).

Interaktionen positiv, nur für Nicastrin ließ sich wie auch in der Publikation von Araki und Kollegen keine Interaktion mit ORMDL-Proteinen nachweisen (Tabelle 3.8). Diese Ergebnisse stützen mit einer komplementären Methode die Annahme von Araki und Kollegen, dass ORMDL eine Verbindung mit den Bestandteilen des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes eingeht und somit - neben der Assoziation mit Asthma - auch einen Einfluss auf die Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ haben könnte.

### 3.1.10 Bestätigung bekannter Interaktionen mit SPTLC1 und SERCA

Im Rahmen der Publikation von Toncheva und Kollegen, zu der Ergebnisse dieser Dissertation beigetragen haben, wurden zwei weitere vorbeschriebene Interaktionen nachvollzogen (Toncheva u. a. 2015). Zum einen hatten Breslow et al. für ORM1 und ORM2 eine Interaktion mit SPT1 beschrieben (Breslow u. a. 2010), zum anderen war aus der Arbeit von Cantero-Recasens eine Interaktion von ORMDL3 mit SERCA bekannt (Cantero-Recasens u. a. 2009).



**Abbildung 3.3:** BRET-Experimente zur Testung der Interaktionen zwischen ORMDL1, ORMDL2 bzw. ORMDL3 und SERCA2 (ATP2A2) bzw. SPT1 (SPTLC1). ORMDL Donorfusionsprotein wurde koexprimiert mit SERCA2 (ATP2A2) bzw. SPT1 (SPTLC1) Akzeptorfusionsprotein in COS-7 Zellen und die BRET-Ratio wurde bestimmt. Das luminaire ER Ca<sup>2+</sup>-Bindungsprotein grp78 (BIP) und die mitochondriale MCAD wurden als Kontrollen verwendet. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 3$  Replikaten. Die gestrichelte Rote Linie stellt den methodenspezifischen oberen Schwellenwert (UT) von 0,0915 dar (Toncheva u. a. 2015).

Es gelang die Bestätigung der Interaktion von SERCA mit ORMDL3 sowie der Nachweis einer Interaktion von SERCA auch mit ORMDL1 und ORMDL2. Weiterhin gelang die Bestätigung der bekannten Interaktion von ORM1 und ORM2 mit SPT1 (Breslow u. a. 2010) für die humanen Homologe ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit dem humanen Homolog SPTLC1 (Abbildung 3.3). Dieser erste Nachweis eines ähnlichen

Interaktionsmusters aller drei humanen ORMDL-Proteine ist zusammen mit den Negativkontrollen MCAD und BIP (HSPA5) Teil der Publikation von Toncheva und Kollegen (2015).

### 3.1.11 Interaktionen mit peroxisomalen Proteinen

Unter den 43 bekannten Interaktionspartnern von ORM1 und ORM2 in *Saccharomyces cerevisiae* befand sich mit PEX29 ein peroxisomales Protein und mit SLT2 ein an der Degradation peroxisomaler Proteine beteiligtes Protein. In der Arbeitsgruppe Molekulare Pädiatrie existiert aufgrund eines Projekts zur Untersuchung des gesamten peroxisomalen Interaktoms sowie weiterer Arbeiten zu peroxisomalen Stoffwechselerkrankungen (Hillebrand u. a. 2012, Kashiwayama u. a. 2005, Muntau u. a. 2000, Muntau 2003) ein cDNA-Repositorium mit BRET-Konstrukten für einen Großteil der peroxisomalen Proteine. Um modellhaft die Wechselwirkungen zwischen ORMDL und dem Proteom einer Organelle zu beschreiben, wurden die PPI zwischen ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 und 42 peroxisomalen Proteinen untersucht. Wir führten auch diese BRET-Interaktionsexperimente in COS-7-Zellen durch (Abschnitt 2.2.10).

Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
ABCD1	0,023	0,028	0,028
ABCD4	0,219	0,158	0,255
ABCD5	0,219	0,130	0,073
ACAA1	0,025	0,039	0,047
ACOT2	0,025	0,029	0,045
ACSL4	0,079	0,034	0,035
ACSL5	0,250	0,400	0,202
ALDH3A2	0,025	0,037	0,082
AMACR	0,019	0,044	0,033
BAAT	0,045	0,049	0,039
DNM1L	0,029	0,015	0,067
EPHX2	0,028	0,055	0,053
FIS1	0,132	0,127	0,101
GNPAT	0,038	0,035	0,043
GSTK1	0,076	0,054	0,063
HACL1	0,076	0,042	0,019

MOSC2	0,084	0,0365	0,019
MPV17	0,167	0,351	0,245
MPV172L2	0,075	0,083	0,040
PEX1	0,037	0,032	0,041
PEX5	0,008	0,024	0,031
PEX6	0,045	0,007	0,044
PEX7	0,053	0,043	0,039
PEX10 <sub>1</sub>	0,031	0,037	0,033
PEX10 <sub>2</sub>	0,013	0,052	0,026
PEX11A	0,058	0,050	0,046
PEX11B	0,052	0,068	0,054
PEX11G	0,051	0,057	0,042
PEX12	0,073	0,088	0,048
PEX13	0,097	0,160	0,107
PEX14	0,026	0,059	0,042
PEX19	0,045	0,077	0,089
PEX26	0,218	0,101	0,153
PXMP3	0,020	0,044	0,021
PXMP4	0,071	0,085	0,081
PHYH	0,047	0,057	0,033
RHOC	0,032	0,063	0,036
SLC25A17	0,197	0,114	0,109
TRIM37	0,074	0,010	0,048

**Tabelle 3.9:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL mit peroxisomalen Proteinen. Angegeben ist jeweils die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Grün: positive PPI (UT: 0,0915); Rot: negative PPI (LT: 0,0859); Grau: in BRET-Interaktionsexperimenten Zuordnung nicht möglich (Werte zwischen LT und UT).

Von den 41 untersuchten Interaktionen waren nur 8 beziehungsweise 19,5 % positiv: ABCD4, ABCD5, ACSL5, FIS1, MPV17, PEX13, PEX26 und SLC25A17 (Tabelle 3.9). Eine Falsch-Positiv-Rate von ca. 2,8 % muss, wie in Abschnitt 2.2.10 dargestellt, bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Für die Membranproteine der ABC-Transporter der Subfamilie D (ABCD4, ABCD5) ist jedoch neben der Lokalisation

in Peroxisomen auch eine ER-Lokalisation bekannt und für PEX26 und PEX13 wird eine Funktion im Trafficking von Proteinen ins Peroxisom angenommen (Gould u. a. 1996, Weller u. a. 2005), sodass eine Interaktion mit ORMDL jeweils weder gegen die aufgestellten Hypothesen spricht noch für eine relevante Funktion von ORMDL im peroxisomalen Proteom sprechen muss.

### 3.1.12 Validierung des ORMDL-Interaktoms mittels eines zufälligen Referenzdatensatzes

Schließlich wurde zur Validierung der bisherigen hypothesengetriebenen Untersuchung von PPI der ORMDL-Proteinfamilie ein Screen gegen 35 zufällig ausgewählte Proteine unseres cDNA-Repositoriums durchgeführt. Dieser Ansatz eines zufälligen Referenzdatensatzes (*random reference set*, RRS) (Vidal 2016) kann genutzt werden, um die Spezifität der Methode zu demonstrieren. Wie bereits in Abschnitt 2.2.10 dargestellt, diente ein zufälliger Referenzdatensatz auch der Etablierung der BRET-spezifischen Schwellenwerte. Zuvor bereits untersuchte Interaktionspartner wurden von einer Ziehung ausgeschlossen. Wir führten auch diese BRET-Interaktionsexperimente in COS-7-Zellen durch.

Proteine	ORMDL1	ORMDL2	ORMDL3
ACADM	0,060	0,073	0,049
ACADS	0,045	0,034	0,026
BCL10	0,033	0,034	0,031
CARD9	0,027	0,032	0,019
COPS5	0,040	0,075	0,059
CXCL1	0,040	0,021	0,037
CXCL2	0,035	0,031	0,060
CXCL3	0,038	0,050	0,066
DDX3Y	0,028	0,045	0,028
DDX5	0,018	0,026	0,018
DIPA	0,026	0,045	0,030
FOS	0,009	0,025	0,063
FYN	0,024	0,006	0,011
GCDH	0,014	0,011	-0,008
GZMB	0,059	0,097	0,087
HADHA	0,028	0,031	0,032

HLX	0,082	0,020	0,043
HNRNPK	0,052	0,020	0,040
IL8	0,049	0,048	0,054
IVD	0,051	0,040	0,047
JUN	0,013	0,030	0,039
KRT17	0,051	0,038	0,016
MIF	0,036	0,076	0,028
RAD50	0,065	0,053	0,067
RPS19	0,036	0,030	0,009
SENP3	0,025	0,006	0,019
SLU7	0,009	0,027	0,040
SNX6	0,006	-0,005	-0,010
SPINK5	0,053	0,050	0,013
TEAD2	0,019	0,069	0,023
TBX21	0,044	0,022	0,030
TCL1A	0,065	0,071	0,068
TUBA3C	0,025	0,030	0,031
TUBB3	-0,046	-0,015	-0,016
UBE2L	0,057	0,061	0,063

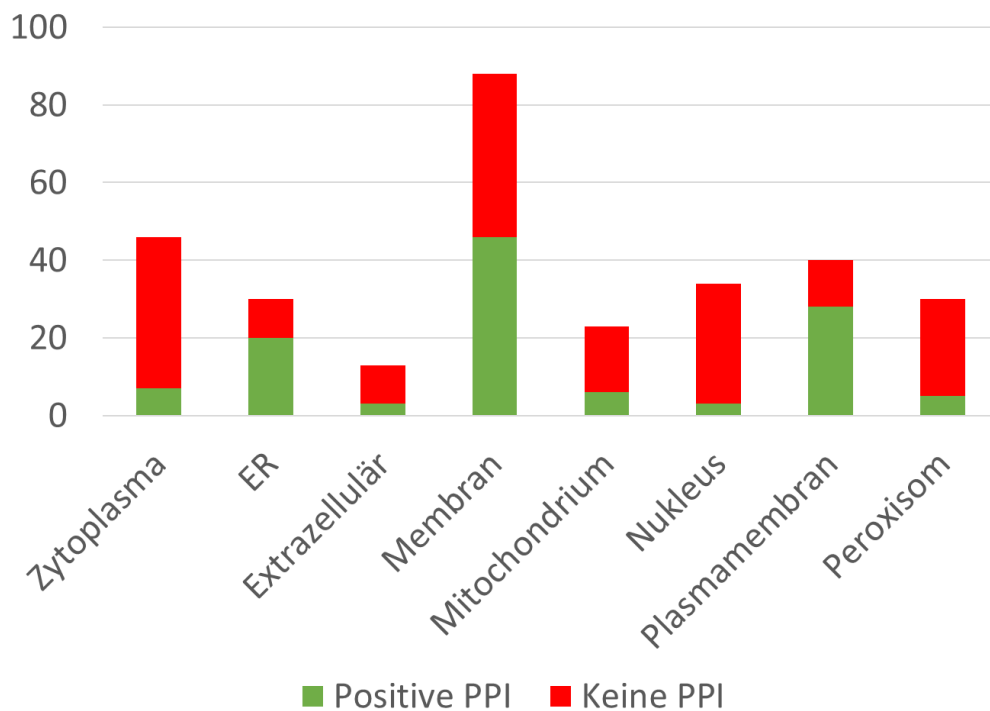
**Tabelle 3.10:** BRET-Ratios der PPI von ORMDL mit zufällig ausgewählten Proteinen (RRS). Angegeben ist jeweils die maximale BRET-Ratio der 8 Tag-Kombinationen. Grün: positive PPI (UT: 0,0915); Rot: negative PPI (LT: 0,0859); Grau: in BRET-Interaktionsexperimenten Zuordnung nicht möglich (Werte zwischen LT und UT).

Nur für eines dieser Proteine ließ sich eine positive Interaktion mit einem Protein der ORMDL-Familie nachweisen: ORMDL2 interagiert mit GZMB (Tabelle 3.10). Auch hier ist eine Falsch-Positiv-Rate von 2,8 % wie in Abschnitt 2.2.10 dargestellt zu erwarten gewesen. Zwei Interaktionen lagen im Graubereich, hier war eine Zuordnung nicht möglich. Diese 35 Proteine haben die folgende subzelluläre Verteilung: Nukleus 22 (62 %), Zytosol 26 (74 %), Mitochondrium 5 (14 %), ER 3 (9 %), Membran 15 (43 %) und Extrazellulärraum 6 (17 %). Eine Zuordnung zu mehreren Kompartimenten ist möglich. Die Zuordnung entspricht den Daten des *Gene Ontology Consortium* (abgerufen am 06.10.2015, Ashburner u. a. 2000). Proteine des ER sind in unserem cDNA-Repositorium unterrepräsentiert, während mitochondriale und nukleäre Proteine überrepräsentiert



sind. Dennoch zeigt der fehlende Nachweis von Interaktionen mit diesen zufällig ausgewählten Proteinen, dass in den vorherigen hypothesengetriebenen Untersuchungen überzufällig viele neue, positive Interaktionen identifiziert werden konnten. Während in den 105 untersuchten Interaktionen mit dem RRS-Datensatz nur 2 positive Interaktionen bestimmt werden konnten (1,9 %), konnten unter den 366 untersuchten Interaktionen in den hypothesengetriebenen Ansätzen 166 positive Interaktionen bestimmt werden (dies entspricht einem Anteil von 45,4 %).

### 3.1.13 Zusammenfassung zur Erweiterung des ORMDL-Interaktoms



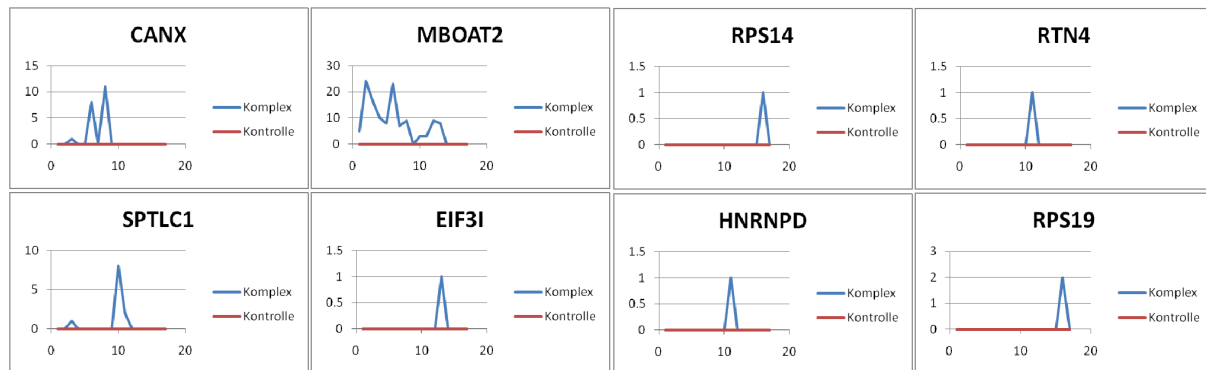
**Abbildung 3.4:** Übersicht über die Verteilung der positiven und negativen Resultate der Interaktionsuntersuchungen für die Proteine der ORMDL-Familie und möglicher Interaktionspartner in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation

ORMDL 1, ORMDL2 und ORMDL3 bilden höhermolekulare Hetero- und Homooligomere. Dies wurde bereits zuvor in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt (Breslow u. a. 2010), konnte in dieser Arbeit jedoch nun auch für die humanen ORMDL-Proteine mit zwei Methoden nachgewiesen werden. Die ORMDL-Proteine interagieren zugleich mit einer Vielzahl anderer Proteine. Von 471 getesteten Interaktionen waren 168 positiv und fünf im Graubereich. ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 teilen fast alle ihre Interaktionspartner, unter allen getesteten Proteinen finden sich nur vier Proteine (FKBP1A, CCL1, ABCD5, GZMB), die nicht zugleich mit allen drei Proteinen der ORMDL-Familie

interagieren. Die ORMDL-Proteine interagieren dabei bevorzugt mit anderen Membranproteinen sowie Proteinen des ER, des Golgi-Apparats und der Plasmamembran.

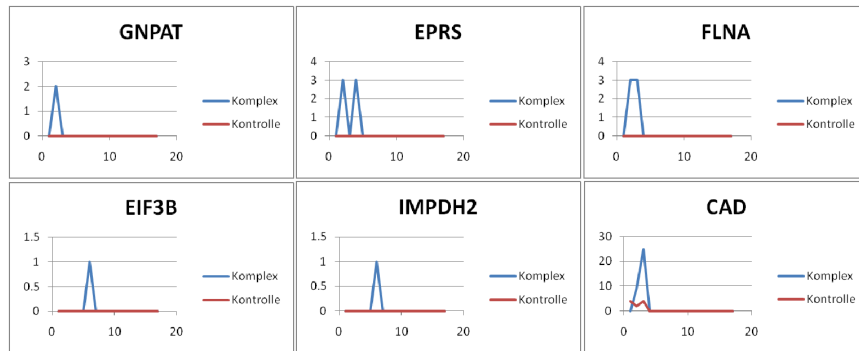
### 3.1.14 Ergänzung eines hypothesenfreien Ansatzes mittels Koimmunpräzipitation zur Erweiterung des ORMDL-Interaktoms

Zur nicht hypothesengetriebenen Erweiterung des ORMDL-Interaktoms wurde eine weitere Methode verwendet. Wie in Abschnitt 2.2.9 dargestellt wurden HEK-Flp-In-293 Zellen stabil transfiziert mit einem pCD001-Vektor, sodass ein Protein A markiertes ORMDL3-Konstrukt in diesen Zellen exprimiert wird. Durch Koimmunpräzipitation und anschließende Tandem-Massenspektroskopie dieser Zellen wurden an der Ruhruniversität Bochum im Labor für Systembiochemie des Instituts für Biochemie und Pathobiochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Schliebs weitere Interaktionspartner von ORMDL3 identifiziert (Bharti u. a. 2011, Gronemeyer u. a. 2013, Wiese u. a. 2007). Im Folgenden sind zum einen die wahrscheinlichen und zum anderen die möglichen Interaktionspartner von ORMDL3 aufgeführt. Es ließen sich 14 möglicherweise



**Abbildung 3.5:** Positive Interaktionspartner von ORMDL3 in der Co-IP. Aufgetragen ist die Masse (m/z) auf der X-Achse gegen *arbitrary units of intensity* auf der Y-Achse, gezeigt werden die *spectral counts* in der Bande des ORMDL-Komplexes (blau) und in der Bande der Flp-In-Zellen ohne genomische Integration (rot). Diese Daten wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Schliebs an der Ruhruniversität Bochum erhoben (Bharti u. a. 2011, Gronemeyer u. a. 2013, Wiese u. a. 2007).

positive Interaktionspartner von ORMDL3 identifizieren, wovon anhand der methodenspezifischen Schwellenwerte der Massenspektroskopie 8 als hochwahrscheinlich und 6 als möglich gewertet werden müssen. Unter den 14 möglichen Interaktionspartnern von ORMDL3 befinden sich 6 nukleäre, 1 peroxisomales, 8 zytoplasmatische und 6 membranständige Proteine, darunter 3 ER-Membranproteine. 7 dieser Proteine haben eine Funktion in der Translation und 3 Proteine im Fettsäurestoffwechsel. Calnexin fungiert als Chaperon und RTN4 kann die APP-Prozessierung (siehe auch Araki u. a.



**Abbildung 3.6:** Möglicherweise positive Interaktionspartner von ORMDL3 in der Co-IP. Aufgetragen ist die Masse (m/z) auf der X-Achse gegen *arbitrary units of intensity* auf der Y-Achse, gezeigt werden die *spectral counts* in der Bande des ORMDL-Komplexes (blau) und in der Bande der Flp-In-Zellen ohne genomische Integration (rot). Diese Daten wurden ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Schliebs erhoben (Bharti u. a. 2011, Gronemeyer u. a. 2013, Wiese u. a. 2007).

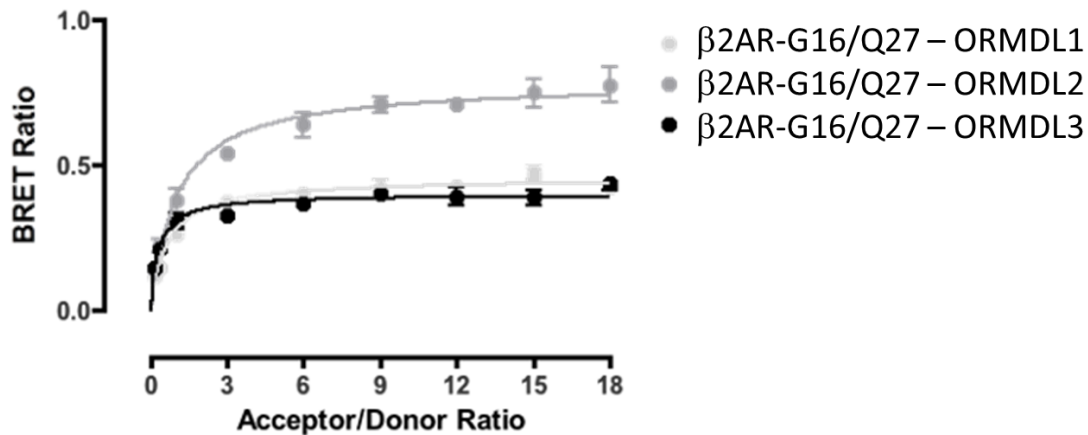
2007 in Kapitel 1.2) inhibieren. Unter den 8 hoch wahrscheinlichen Interaktionspartnern sind mit SPTLC1 und CANX zwei bereits durch Breslow und Kollegen bzw. durch Cantero-Recasens und Kollegen identifizierte Proteine, die durch uns bereits mittels BRET bestätigt wurden. Die Bestätigung der Interaktion mit SPTLC1 ist Teil der Publikation zur Assoziation von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit Asthma (Toncheva u. a. 2015). Die 12 anderen identifizierten ORMDL3-Interaktionspartner waren hingegen im Zusammenhang mit ORMDL bisher nicht untersucht worden. Eine Ausnahme bildet RPS19, das in unserer zufälligen Referenzauswahl enthalten war und als negativ gewertet wurde.

## 3.2 ORMDL und der $\beta_2$ -AR

Wie in Abschnitt 3.1.7 dargestellt, konnten wir für das ORMDL-Interaktom einige Interaktionen mit in der Asthmapathogenese relevanten Membranrezeptoren nachweisen, darunter der GPCR  $\beta_2$ -AR. Es handelt sich um den ersten Nachweis einer PPI zwischen den ORMDL-Proteinen und  $\beta_2$ -AR. Im Folgenden haben wir uns der genaueren Charakterisierung der Interaktion von ORMDL und  $\beta_2$ -AR gewidmet. Hierzu erfolgte (1) eine genauere Untersuchung der Interaktion von ORMDL3 mit dem  $\beta_2$ -AR mittels BRET-Sättigungsexperimenten, (2) die Bestätigung dieser Interaktion durch eine zweite Methode (Co-IP), (3) die Untersuchung der Homo- und Heterooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-Varianten (BRET), (4) die Untersuchung der  $\beta_2$ -AR-Oberflächenexpression unter dem Einfluss von ORMDL (ELISA) und schließlich (5) die Untersuchung der Interaktion von ORMDL3 mit den  $\beta_2$ -AR-Varianten unter dem Einfluss von  $\beta$ -Sympathomimetika (BRET).

### 3.2.1 Charakterisierung der Interaktion von ORMDL mit $\beta_2$ -AR mittels BRET-Sättigungsexperimenten

Zunächst wurde die Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit dem  $\beta_2$ -AR untersucht. Diese Experimente erfolgten in HEK-293 Zellen mit 1  $\mu$ g DNA pro Transfektion. Es wurden die pDEST-Vektoren ORMDL1-N-Venus, ORMDL2-N-Venus und ORMDL3-N-Venus sowie pDEST- $\beta_2$ -AR-G16/Q27-N-hRluc verwendet.



**Abbildung 3.7:** BRET-Sättigungskurven für die Interaktion von  $\beta_2$ -AR-N-hRluc-G16/Q27 (WT) mit ORMDL1-N-Venus, ORMDL2-N-Venus oder ORMDL3-N-Venus zur Bestimmung der BRET<sub>50</sub> als Maß für die relative Bindungsaffinität und der maximalen BRET-Ratio (Plateau der BRET-Ratio in den Sättigungsexperimenten (BRET<sub>max</sub>)) als Maß für die Entfernung der BRET-Markerproteine voneinander. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (n=5, unabhängige Experimente).

Es zeigt sich (Abbildung 3.7), dass  $\beta_2$ -AR auf Proteinebene mit ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 interagiert. Die höchste relative Bindungsaffinität findet sich für die Interaktion von  $\beta_2$ -AR mit ORMDL3, dem zuerst mit Asthma assoziierten Gen, mit einer BRET<sub>50</sub> von 0,31, die somit zwei- ( $p = 0,021$ , Bonferroni korrigiert  $p > 0,05$ ) bzw. dreimal ( $p = 0,004$ , Bonferroni korrigiert  $p < 0,05$ ) höher ist als die relative Bindungsaffinität von  $\beta_2$ -AR zu ORMDL1 oder ORMDL2 (Tabelle 3.11). Der Komplex aus ORMDL2 und  $\beta_2$ -AR zeigte zudem eine signifikant ( $p < 0,05$  nach Bonferroni-Korrektur für ORMDL2 vs. ORMDL1 und ORMDL2 vs. ORMDL3) höhere BRET<sub>max</sub> (ORMDL1 0,46; ORMDL2 0,78; ORMDL3 0,40), was auf einer anderen N-terminalen tertiären Konformation beruhen kann (Abbildung 3.7).

Kombination	BRET <sub>50</sub>	Vergleich	p-Wert
$\beta_2$ -AR-G16/Q27 + ORMDL1	0,65 ± 0,08	vs. $\beta_2$ -AR-G16/Q27 + ORMDL2	> 0,05
$\beta_2$ -AR-G16/Q27 + ORMDL2	1,03 ± 0,16	vs. $\beta_2$ -AR-G16/Q27 + ORMDL3	< 0,05
$\beta_2$ -AR-G16/Q27 + ORMDL3	0,31 ± 0,05	vs. $\beta_2$ -AR-G16/Q27 + ORMDL1	> 0,05

**Tabelle 3.11:** Unterschiede der BRET<sub>50</sub>-Mittelwerte ± Standardfehler für die PPI von ORMDL1, ORMDL2 bzw. ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR. Statistische Testung durch einfache ANOVA mit Bonferroni-Korrektur.

### 3.2.2 Bestätigung der Interaktion von ORMDL mit $\beta_2$ -AR mittels Koimmunpräzipitation

Die mittels BRET gefundene neue Interaktion zwischen den ORMDL-Proteinen und  $\beta_2$ -AR wurde mit einer zweiten Methode bestätigt. Hierzu wurde wiederum die Koimmunpräzipitation in COS-7-Zellen (Abschnitt 2.2.11) verwendet. Untersucht wurden die Kombinationen ORMDL1-V5 mit  $\beta_2$ -AR-HA, ORMDL2-V5 mit  $\beta_2$ -AR-HA und ORMDL3-V5 mit  $\beta_2$ -AR-HA. Als Kontrollen wurden ORMDL3-HA mit  $\beta_2$ -AR-V5 (gedrehte Tag-Kombination) und eine negative Kontrolle mit PAH-V5 und ORMDL3-HA verwendet sowie als weitere interne Kontrolle die bereits zuvor gezeigte ORMDL3 Homodimerisierung (Abbildung 3.1) mitgeführt. Zur Detektion wurden die Antikörper Ratten-Anti-Hämagglutinin- (Anti-HA) (Verdünnung 1:48), Maus-Anti-V5- (Verdünnung 1:5000) und Ziegen-Anti-Maus-IgG-HRP (Verdünnung 1:10000) verwendet. Die



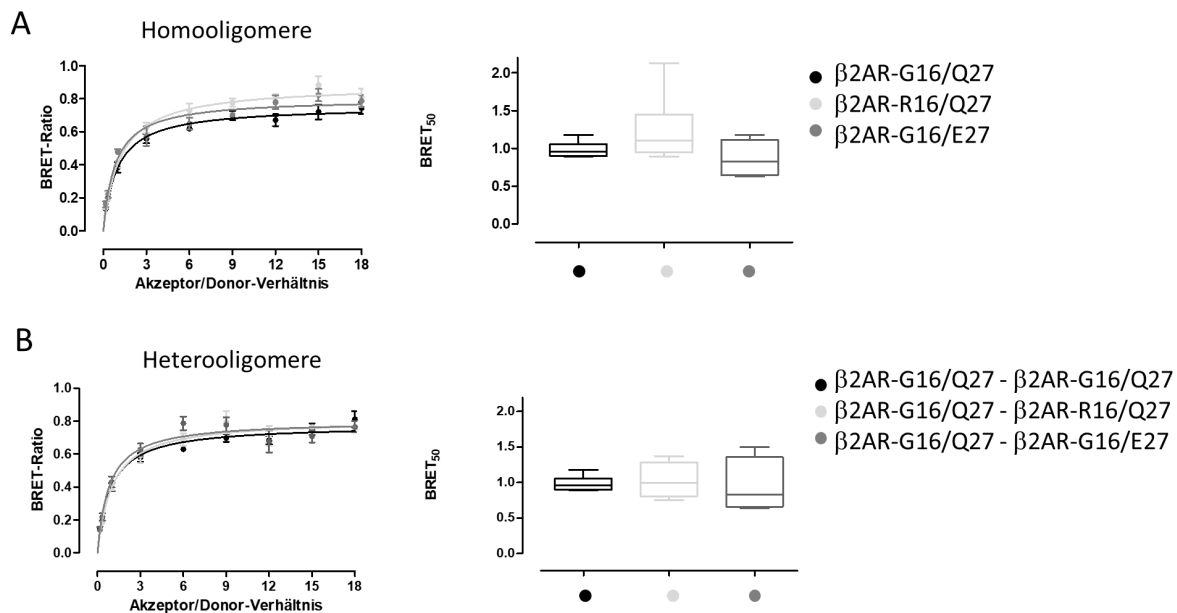
**Abbildung 3.8:** Darstellung der Ergebnisse für die Co-IP der Oligomerisierung der ORMDL-Proteine mit  $\beta_2$ -AR. Es wurden  $\beta_2$ -AR-Proteine, die ein N-terminales HA-Tag tragen, präzipitiert mit einem Anti-HA-Antikörper (IP) und dann die ORMDL-Proteine detektiert mit einem Anti-V5-Antikörper (IB). Zudem wurde (gedrehte Tag-Kombination) auch ORMDL3-HA präzipitiert und dann  $\beta_2$ -AR-V5 detektiert. Dargestellt sind die nachweisbaren Banden im Eluat für die Oligomerisierung von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR.

spezifischen Banden für die Proteine ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 konnten mit dem Anti-V5-Antikörper nachgewiesen werden im  $\beta_2$ -AR-Präzipitat, wie auch die spezifische Bande für  $\beta_2$ -AR in der gedrehten Tag-Kombination im ORMDL3-Präzipitat. Die Koimmunpräzipitation bestätigt die Ergebnisse der BRET-Interaktionsexperimente (Abbildung 3.8).

### 3.2.3 Untersuchung der $\beta_2$ -AR Oligomerisierung in Abhängigkeit der häufigsten Polymorphismen mittels BRET

Wir untersuchten in einem nächsten Schritt die  $\beta_2$ -AR-Homooligomerisierung mittels BRET, um zu testen, ob die aus der Literatur bekannten Eigenschaften in unserem BRET-System nachvollzogen werden können und die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR nachweisbar ist. Für die Untersuchung von PPI ist der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor ( $\beta_2$ -AR) von besonderem Interesse, weil sich in den letzten Jahren die Erkenntnis durchsetzen konnte, dass  $\beta_2$ -AR als Dimer oder sogar höhergradiges Oligomer seine Funktion an der Zelloberfläche ausübt und nicht wie zuvor vermutet als Monomer. So wurde durch BRET-Experimente gezeigt, dass  $\beta_2$ -AR Homodimere bildet, diese bereits im ER entstehen und auch in der Plasmamembran an der Zelloberfläche Dimere nachweisbar sind (Cao u. a. 2005, Hebert u. a. 1996, Lan u. a. 2011, Mercier 2002, Salahpour 2004). Für die Fusionsproteine von Rluc und GFP mit *ADRB2* ist auch bekannt, dass sie in Zellkulturen von transgenen Mäusen funktionell sind, unveränderte pharmakologische Eigenschaften haben und eine erhaltene Fähigkeit zur Dimerisierung zeigen (Angers u. a. 2000, Bubnell u. a. 2013, Huang u. a. 2009). Vor der weiteren Charakterisierung der PPI zwischen  $\beta_2$ -AR und den Proteinen der ORMDL-Familie wurde zudem mit BRET-Sättigungsexperimenten die Homo- und Heterooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 in HEK-293 Zellen untersucht, um eventuelle Unterschiede in der Oligomerisierung mit ORMDL gegenüber Unterschieden in der Homo- und Heterooligomerisierung der  $\beta_2$ -AR-Varianten abwägen zu können. Bei diesen drei Varianten handelt es sich um die häufigsten im Zusammenhang mit Asthma untersuchten Polymorphismen des *ADRB2*-Gens (Contopoulos u. a. 2005). Mutationen innerhalb des *ADRB2*-Gens, die zu einer defekten Dimerisierungsdomäne (L284 in Transmembrandomäne VI) führen, reduzieren die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR um mindestens 50 % trotz erhaltener Rezeptorkonformation und -funktion (Salahpour 2004). Mutationen innerhalb der ER-Retentions-Regionen üben einen dominant-negativen Effekt auf das Trafficking von unveränderten  $\beta_2$ -AR zur Zelloberfläche aus (Salahpour 2004). Dies ist eine wichtige Erkenntnis, denn so könnten verschiedene  $\beta_2$ -AR-Allele auch einen dominanten Effekt auf das Wildtyp-Allel ausüben. Mit einem Peptid, das an die Transmembrandomäne VI bindet, lässt sich andererseits die Dimerisierung verhindern, nicht aber das Trafficking an die Zelloberfläche (Hebert u. a. 1996). Für die Homodimerisierung wichtig sind die Domänen Leu284 (Salahpour 2004), Gly84 (Hebert u. a. 1996) und die Transmembrandomäne VI über hydrophobe Wechselwirkungen (Gly276, Gly280, Leu284) (Hebert u. a. 1996). Auch die Möglichkeit, dass es sich bei den Komplexen nicht

um Dimere, sondern um höhermolekulare Oligomere handelt, wurde bereits untersucht mittels FRET durch Fung et al.: hierzu wurden gereinigte  $\beta_2$ -AR, die fluoreszierende Marker tragen, in eine Doppellipidschicht eingebettet. Sie lagen vorwiegend als Tetramere vor, auf die Gabe eines inversen Agonisten hin sogar als Oktamere. Wurden hingegen stimulierende G-Proteine hinzugegeben, so waren die Oligomere deutlich instabiler, was dahingehend gedeutet wurde, dass höhermolekulare Oligomere inaktive Zustände des Rezeptors darstellen könnten. Aufgrund der Untersuchung in reinen Doppellipidschichten konnte zudem bewiesen werden, dass  $\beta_2$ -AR ohne Einfluss weiterer Proteine Oligomere bilden kann. Einschränkend ist jedoch festzustellen, dass es sich um eine deutliche Überexpression der Rezeptoren in der Doppellipidschicht handelte, sodass es auch zu einer unphysiologischen Bildung von Oligomeren kommen könnte (Fung u. a. 2009). Auch bis auf die Ebene einzelner Rezeptoren wurde  $\beta_2$ -AR bereits dargestellt und es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren frei in der Plasmamembran diffundieren, zugleich in Abhängigkeit von der  $\beta_2$ -AR-Konzentration an der Zelloberfläche als Monomere, Dimere, Trimere und Tetramere vorliegen und dies auch bereits bei fast physiologischen Konzentrationen (Calebiro u. a. 2013). Wir konnten in unserem BRET-



**Abbildung 3.9:** Sättigungskurven der PPI für die (A) Homooligomerisierung bzw. (B) Heterooligomerisierung der  $\beta_2$ -AR-Varianten (als Referenz ist hier die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 erneut aufgeführt). Dargestellt sind jeweils die Sättigungskurven (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts) sowie die BRET<sub>50</sub> als Boxplot mit Angabe der minimalen und maximalen Werte durch die Antennen aus  $n \geq 4$  unabhängigen Experimenten.

System bestätigen, dass  $\beta_2$ -AR Homooligomere bildet (Abbildung 3.9). Dies gilt sowohl für die Homooligomerisierung des häufigsten Haplotyp  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 als auch für die beiden anderen Rezeptorvarianten  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27. Weiterhin konnten wir erstmals nachweisen, dass sich die Bindungsaffinitäten der verschiedenen

Haplotypen in der Hetero- und Homooligomerisierung dieser drei Varianten gleichen, denn sowohl in der Heterooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 mit  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27 als auch in der Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 oder  $\beta_2$ -AR-G16/E27 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in einer einfachen ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche (Tabelle 3.12) und somit kein Hinweis auf ein bevorzugtes Auftreten einer Hetero- oder Homooligomerisierung von Varianten der  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren.

Kombination	BRET <sub>50</sub>	p-Wert
$\beta_2$ -AR-G16/Q27 + $\beta_2$ -AR-G16/Q27	$0,93 \pm 0,11$	$> 0,05$
$\beta_2$ -AR-R16/Q27 + $\beta_2$ -AR-R16/Q27	$1,02 \pm 0,15$	$> 0,05$
$\beta_2$ -AR-G16/E27 + $\beta_2$ -AR-G16/E27	$0,83 \pm 0,13$	$> 0,05$
$\beta_2$ -AR-G16/Q27 + $\beta_2$ -AR-R16/Q27	$1,03 \pm 0,16$	$> 0,05$
$\beta_2$ -AR-G16/Q27 + $\beta_2$ -AR-G16/E27	$0,82 \pm 0,13$	$> 0,05$

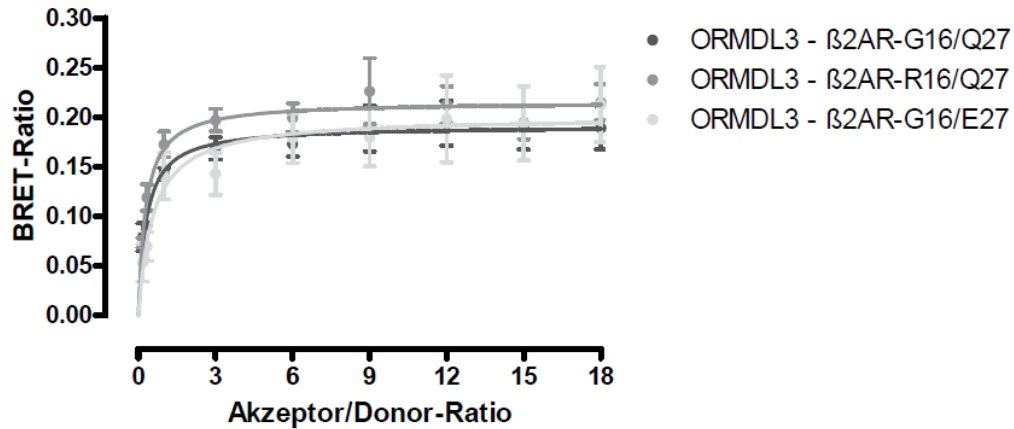
**Tabelle 3.12:** BRET<sub>50</sub>-Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler für die PPI der  $\beta_2$ -AR-Varianten aus  $n \geq 4$  unabhängigen Experimenten. Statistische Testung durch einfache ANOVA mit Bonferroni-Korrektur.

### 3.2.4 Interaktion zwischen ORMDL3 und den $\beta_2$ -AR-Varianten mit unterschiedlicher Affinität

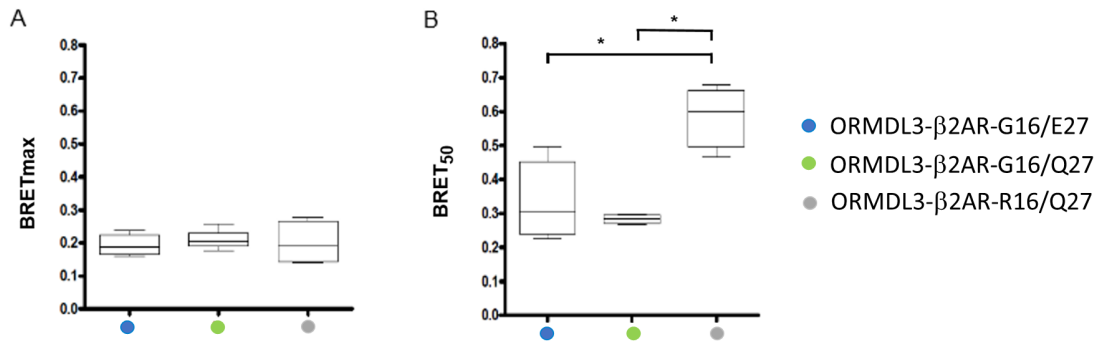
In einem nächsten Schritt wurde die Interaktion von ORMDL mit den verschiedenen  $\beta_2$ -AR-Allelen untersucht. Da ORMDL3 im Vergleich zu ORMDL1 und ORMDL2 die höchste relative Affinität für die Bindung mit  $\beta_2$ -AR aufwies und ORMDL3 (Moffatt u. a. 2007) vor ORMDL1 und ORMDL2 (Toncheva u. a. 2015) als relevant für die Pathogenese von Asthma identifiziert worden ist, wurde nur ORMDL3 genauer charakterisiert. Diese Experimente erfolgten in HEK-293 Zellen mit 1  $\mu$ g DNA pro Transfektion. Es wurden die pDEST-Vektoren ORMDL3-N-hRluc und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27-N-Venus,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27-N-Venus bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27-N-Venus verwendet.

Auch für die  $\beta_2$ -AR-Varianten  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 konnte eine Interaktion mit ORMDL3 nachgewiesen werden. Die BRET<sub>max</sub> unterschied sich nicht signifikant (einfache ANOVA) für die einzelnen  $\beta_2$ -AR-Varianten, hingegen war die relative Bindungsaffinität signifikant geringer für die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR-G16/E27 ( $BRET_{50} = 0.59 \pm 0.04$ ) verglichen mit ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 ( $BRET_{50} = 0.33 \pm 0.06$ ) oder ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 ( $BRET_{50} = 0.28 \pm 0.01$ ) (Abbildung 3.11). Hier konnte somit erstmals nachgewiesen werden, dass die Bildung von Heterooligomeren zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR abhängig sein kann von  $\beta_2$ -AR-Haplotypen, die möglicherweise einen Einfluss auf die Wirksamkeit von  $\beta$ -Sympathomimetika haben.





**Abbildung 3.10:** Sättigungskurven der PPI zwischen ORMDL3 und den  $\beta_2$ -AR-Varianten  $\beta_2$ -AR-G16/Q27,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts ( $n = 4$ , unabhängige Experimente).



**Abbildung 3.11:** Dargestellt sind als Boxplot mit Angabe des minimalen und maximalen Werten durch die Antennen (A) die BRETmax sowie (B) die relative Bindungsaffinität BRET<sub>50</sub> jeweils für die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR-G16/Q27,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27 ( $n = 4$ , unabhängige Experimente). Signifikanz nach einfacher ANOVA mit Bonferonni-Korrektur  $p < 0,05$ .

### 3.2.5 Modulation der Interaktionen von ORMDL mit $\beta_2$ -AR durch $\beta$ -Sympathomimetika in Abhängigkeit vom $\beta_2$ -AR-Allel

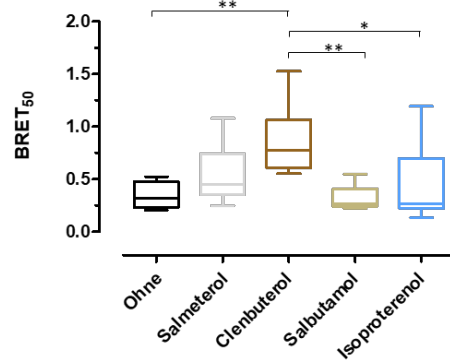
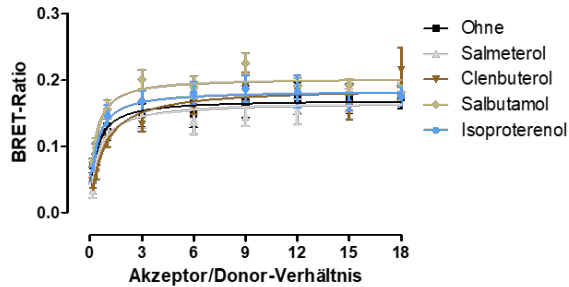
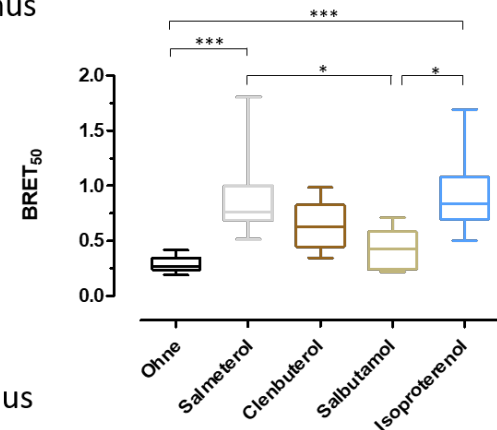
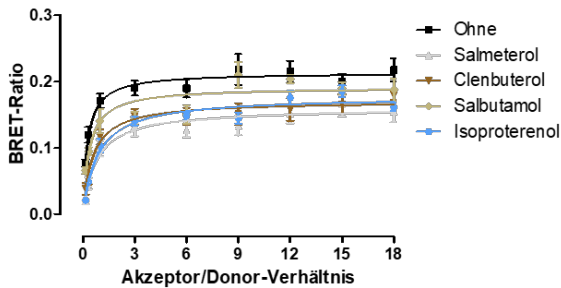
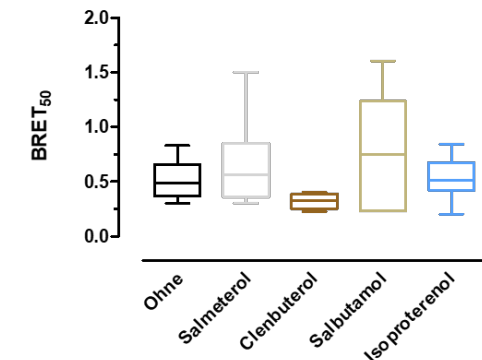
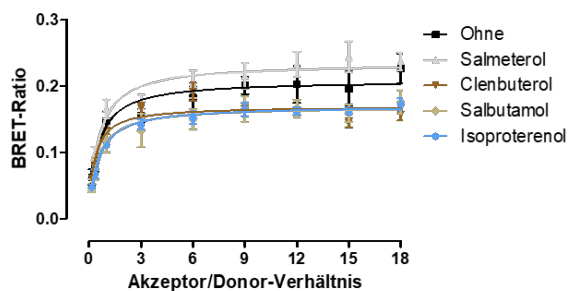
Wir konnten zeigen, dass auch ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR interagiert und die Bindungsaffinität durch  $\beta_2$ -AR-Haplotypen beeinflusst werden kann. Es ist bereits bekannt, dass  $\beta$ -Sympathomimetika die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR verstärken können (Hebert u. a. 1996). Daher untersuchten wir, ob die Interaktion zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR wiederum durch  $\beta$ -Sympathomimetika beeinflusst wird. Verwendet wurden Clenbuterol (0,5  $\mu$ M), Isoproterenol (1  $\mu$ M), Salmeterol (0,2  $\mu$ M) und Salbutamol (1,25  $\mu$ M). Aufgrund der Lokalisation von ORMDL3 im ER bestand die Hypothese, dass nur lipophile  $\beta$ -Sympathomimetika (Clenbuterol und Salmeterol) einen Einfluss auf die PPI von ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR haben können. Zudem wurden kurz- (Clenbuterol, Salbutamol, Isoproterenol) und lang-wirksame (Salmeterol)  $\beta$ -Sympathomimetika verwendet. Die Experimente wurden in HEK-293-Zellen mit den BRET-Vektoren pDEST-ORMDL3-N-hRluc und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27-N-Venus,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27-N-Venus bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27-N-Venus durchgeführt.

Die Interaktion zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 (Abbildung 3.12 (A)) wurde nur durch Clenbuterol beeinflusst, das die relative Affinität der Bindung signifikant verminderte ( $\text{BRET}_{50}$   $0,86 \pm 0,12$ ) gegenüber der Kontrollbedingung ohne Medikamentenzugabe ( $p < 0,05$ , Bonferroni-korrigiert). Für die Interaktion zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 (Abbildung 3.12 (B)) zeigte sich, dass die  $\text{BRET}_{50}$  durch alle  $\beta$ -Sympathomimetika erhöht wird, dieser Einfluss war allerdings nur für Salmeterol ( $\text{BRET}_{50}$   $0,89 \pm 0,14$ ;  $p < 0,05$ , Bonferroni-korrigiert) und Isoproterenol ( $\text{BRET}_{50}$   $0,92 \pm 0,13$ ;  $p < 0,05$ , Bonferroni-korrigiert) signifikant. Für die Interaktion zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 (Abbildung 3.12 (C)) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der  $\text{BRET}_{50}$  nach Bonferroni-Korrektur und somit keine Unterschiede in der Affinität unter der Zugabe der verschiedenen  $\beta$ -Sympathomimetika.

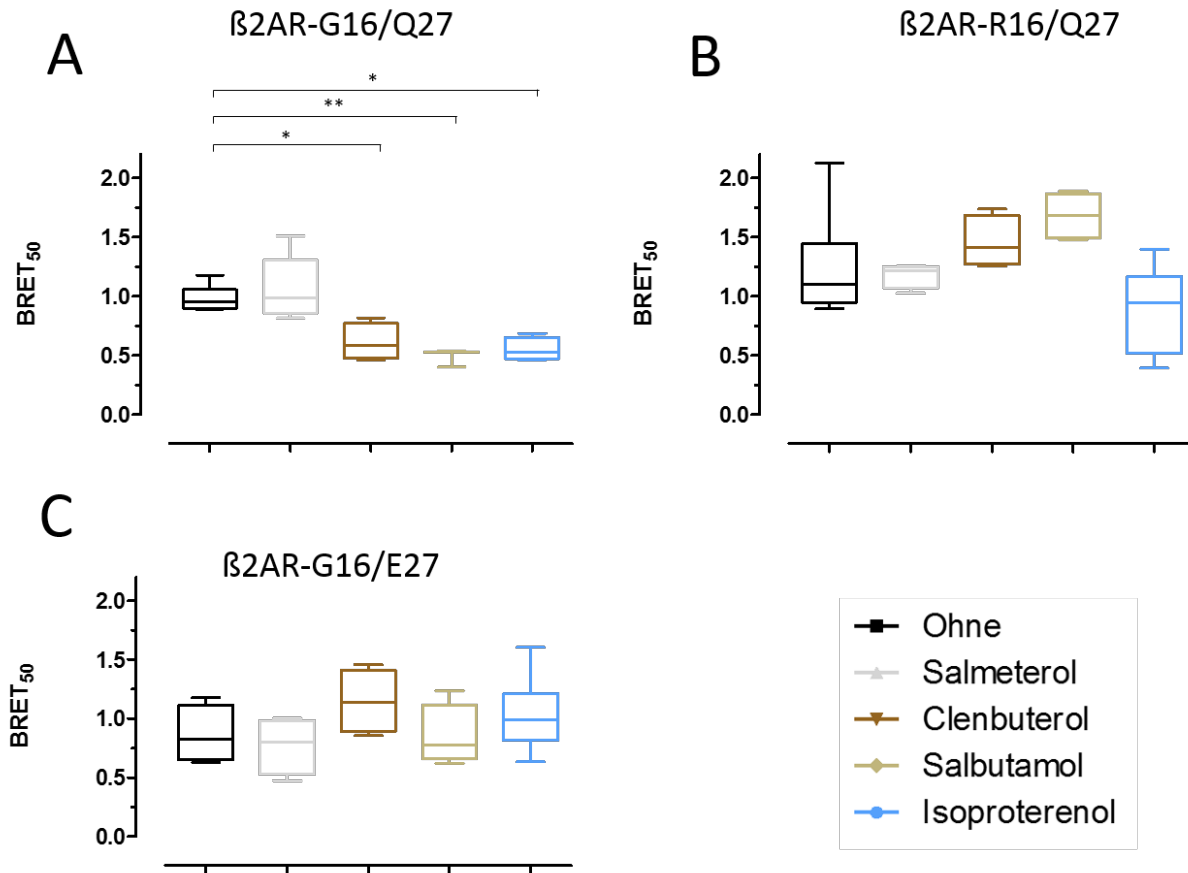
### 3.2.6 Modulation der $\beta_2$ -AR Homooligomerisierung durch $\beta$ -Sympathomimetika in Abhängigkeit vom $\beta_2$ -AR-Allel

$\beta$ -Sympathomimetika haben einen Einfluss auf die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR (Hebert u. a. 1996). Abschließend wurde nun untersucht, ob sich dies in unserem BRET-System nachvollziehen lässt und ob die  $\beta$ -Sympathomimetika einen unterschiedlichen Einfluss auf die Homooligomerisierung der  $\beta_2$ -AR-Varianten haben, wie er bereits für die Interaktion mit ORMDL3 gezeigt wurde. Es erfolgte die Testung unter dem Einfluss von Clenbuterol (0,5  $\mu$ M), Isoproterenol (1  $\mu$ M), Salmeterol (0,2  $\mu$ M) oder Salbutamol (1,25  $\mu$ M) wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben. Die Experimente wurden in HEK-293-Zellen durchgeführt. Verwendet wurden die BRET-Vektoren (pDEST) für  $\beta_2$ -AR-G16/Q27-N-Venus,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27-N-Venus bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27-N-Venus und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27-N-hRluc,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27-N-hRluc bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27-N-hRluc.

Für den häufigsten Haplotyp  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 konnte die aus der Literatur bekann-

**A** ORMDL3-N-hRluc und  $\beta_2$ AR-G16/Q27-N-Venus**B** ORMDL3-N-hRluc und  $\beta_2$ AR-R16/Q27-N-Venus**C** ORMDL3-N-hRluc und  $\beta_2$ AR-G16/E27-N-Venus

**Abbildung 3.12:** BRET-Sättigungskurven der PPI zwischen ORMDL3 und den  $\beta_2$ -AR-Varianten (A)  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 (B)  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und (C)  $\beta_2$ -AR-G16/E27 unter dem Einfluss von vier verschiedenen  $\beta$ -Sympathomimetika. Dargestellt sind jeweils die Sättigungskurven sowie die BRET<sub>50</sub> als Boxplot mit Angabe der minimalen und maximalen Werte durch die Antennen. Durch \*, \*\* und \*\*\* sind die in einer einfachen ANOVA mit Bonferroni Korrektur signifikanten Unterschiede der BRET<sub>50</sub> angegeben. Signifikanzniveaus \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. Es handelt sich um Ergebnisse aus n=4 Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

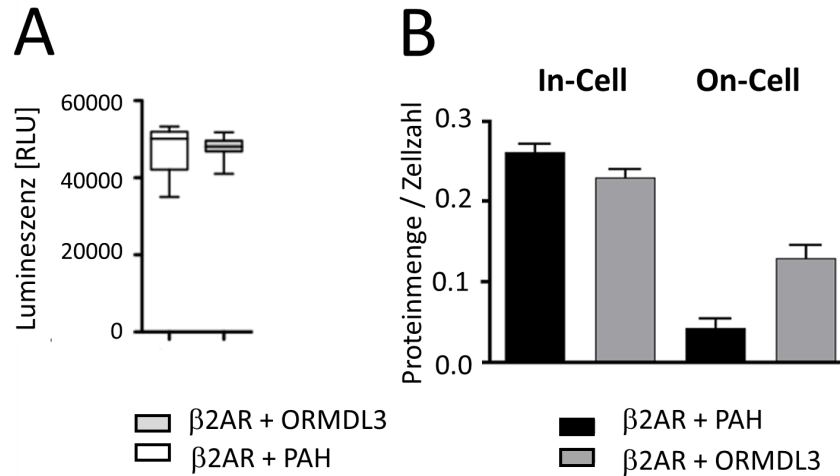


**Abbildung 3.13:** BRET<sub>50</sub> der Homooligomerisierung der  $\beta_2$ -AR-Varianten (A)  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 (B)  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und (C)  $\beta_2$ -AR-G16/E27 unter dem Einfluss von vier verschiedenen  $\beta$ -Sympathomimetika. Dargestellt ist die BRET<sub>50</sub> als Boxplot mit Angabe der minimalen und maximalen Werte durch die Antennen. Durch \* und \*\* sind die in einer einfachen ANOVA mit Bonferroni Korrektur signifikanten Unterschiede der BRET<sub>50</sub> angegeben. Signifikanzniveaus \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Es handelt sich um Ergebnisse aus  $n \geq 4$  unabhängigen Experimenten.

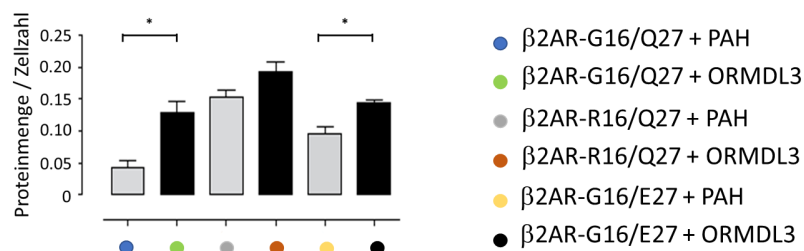
te Beeinflussung der Homooligomerisierung durch Isoproterenol (Hebert u.a. 1996) nachvollzogen werden. Es zeigte sich eine auch nach Bonferroni-Korrektur signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere  $BRET_{50}$  und somit eine deutlich stärkere Bindungsaffinität nach der Zugabe von Isoproterenol (Abbildung 3.13 (A)). Die  $BRET_{50}$  lag ohne  $\beta$ -Sympathomimetikum bei  $1,02 \pm 0,12$ , nach Zugabe von Isoproterenol bei  $0,55 \pm 0,10$ , nach Zugabe von Salbutamol bei  $0,49 \pm 0,07$ , nach Zugabe von Clenbuterol bei  $0,61 \pm 0,16$  und nach Zugabe von Salmeterol bei  $1,06 \pm 0,23$ . Die Affinität wurde also auch durch Salbutamol und Clenbuterol signifikant ( $p < 0,05$  nach Bonferroni-Korrektur) erhöht. Für die selteneren Haplotypen  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede der  $BRET_{50}$  und somit keine Beeinflussung der Bindungsaffinität der Homooligomerisierung durch die Zugabe der verschiedenen  $\beta$ -Sympathomimetika (Abbildung 3.13 (B) und (C)).

### 3.2.7 $\beta_2$ -AR-Oberflächenexpression unter ORMDL-Einfluss im In-Cell/On-Cell-ELISA

Wie bereits in Abschnitt 3.1.8 beschrieben haben wird aufgrund der Lokalisation der ORMDL-Proteine im ER sowie den PPI mit zahlreichen Membranproteinen und Chaperonen die Hypothese einer übergeordneten Funktion von ORMDL als Chaperon oder akzessorisches Protein aufgestellt. Um diese Hypothese zu prüfen, haben wir den Einfluss von ORMDL auf die Oberflächenexpression des Asthmapathogenese-relevanten  $\beta_2$ -AR untersucht. Auch diese Experimente wurden nur für ORMD3 durchgeführt. Zur Untersuchung der Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR wandten wir die In-Cell/On-Cell-ELISA Methode an, wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben. Die In-Cell/On-Cell-ELISA Experimente wurden in transient mit pEF-DEST51-Vektoren transfizierten HEK-293 Zellen durchgeführt. Untersucht wurde die Kombination von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR-G16/Q27,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27 sowie zur Kontrolle die Kombination von PAH mit den  $\beta_2$ -AR-Varianten (Abbildung 3.15). Um auszuschließen, dass die Gesamtmenge an  $\beta_2$ -AR-Expression in einer Kotransfektion mit ORMDL3 durch ORMDL3 beeinflusst wird, wurde auch die Expression von  $\beta_2$ -AR-N-hRluc (pEF-DEST51-ADRB2-N-hRluc-Vektor) in Zellen nach Kotransfektion mit dem pEF-DEST51-ORMDL3 bzw. pEF-DEST51-PAH verglichen (Abbildung 3.14). In Abbildung 3.14 (A) ist zu sehen, dass sich das Luciferasesignal nach der Koexpression von ORMDL3 gegenüber einer Kontrollbedingung mit PAH nicht unterscheidet. In Abbildung 3.14 (B) ist zu sehen, dass auch in den In-Cell ELISA Experimenten die Proteinmenge pro Zelle von  $\beta_2$ -AR in der Koexpression mit ORMDL3 mit  $0,23 \pm 0,01$  verglichen mit  $0,26 \pm 0,01$  unter Koexpression von PAH nicht verschieden ist ( $p = 0,07$ ). Die  $\beta_2$ -AR-Oberflächenexpression hingegen wurde durch die Kotransfektion mit ORMDL3 gegenüber der Kotransfektion mit PAH signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht von  $0,042 \pm 0,01$  auf  $0,13 \pm 0,02$ . Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass sich die Affinität von ORMDL3 zu den  $\beta_2$ -AR-Varianten  $\beta_2$ -AR-G16/Q27,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 bzw.  $\beta_2$ -AR-G16/E27 unterscheidet, wurde nun auch untersucht, ob die Oberflächenexpression im In-Cell/On-Cell ELISA dadurch beeinflusst



**Abbildung 3.14:** Dargestellt ist (A) der Nachweis gleicher Expressionsstärke des transient transfizierten  $\beta_2$ -AR-N-hRluc-Konstrukts unter Kotransfektion mit PAH bzw. ORMDL3 (Boxplot mit Angabe der minimalen und maximalen Werte durch die Antennen) im Luciferaseassay und (B) die im Vergleich zwischen Kotransfektion mit PAH bzw. ORDML3 durch ORMDL3 erhöhte Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR (G16/Q27) im Vergleich zwischen In-Cell- und On-Cell-ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ( $n = 8$  Messungen). Proteinmenge entspricht der Absorption bei 450 nm, Zellmenge der Absorption bei 615 nm.



**Abbildung 3.15:** Dargestellt sind die On-Cell ELISA Ergebnisse für die Kotransfektion der  $\beta_2$ -AR-Varianten mit PAH (grau) bzw. ORMDL3 (schwarz). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ( $n = 8$  Messungen). \* kennzeichnet nach Bonferroni-Korrektur signifikante unterschiedliche Vergleiche. Proteinmenge entspricht der Absorption bei 450 nm, Zellmenge der Absorption bei 615 nm.

wird. Im In-Cell-ELISA gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtexpression der  $\beta_2$ -AR-Varianten in Zellen mit oder ohne ORMDL-Überexpression ( $p > 0,05$  in der einfachen ANOVA). Die On-Cell-ELISA-Ratio für  $\beta_2$ -AR wurde hingegen in Abhängigkeit von der  $\beta_2$ -AR-Variante durch eine ORMDL3-Überexpression beeinflusst. Die durchschnittliche On-cell-ELISA-Ratio für  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 war  $0,04 \pm 0,01$  verglichen mit  $0,13 \pm 0,02$  für ORMDL3-kotransfizierte Zellen ( $p < 0,001$ , einfache ANOVA), für  $\beta_2$ -AR-R16/Q27  $0,15 \pm 0,01$  verglichen mit  $0,19 \pm 0,02$  für ORMDL3-kotransfizierte Zellen ( $p > 0,05$ , einfache ANOVA) und für  $\beta_2$ -AR-G16/E27  $0,10 \pm 0,01$  verglichen mit  $0,14 \pm 0,01$  für ORMDL3-kotransfizierte Zellen ( $p < 0,05$ , einfache ANOVA). Somit war die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 signifikant erhöht nach Überexpression von ORMDL3 verglichen mit der Kontrollbedingung, während die Erhöhung der Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 nicht signifikant war. Die Zunahme der Oberflächenexpression war stärker ausgeprägt für  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 (3,3-fach) verglichen mit  $\beta_2$ -AR-G16/E27 (1,4-fach) und  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 (1,3-fach).

# Kapitel 4

## Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse im Kontext der zuvor aufgestellten Zielsetzung der Arbeit diskutiert werden. Ziel dieser Dissertation war die funktionelle Charakterisierung der ORMDL-Proteinfamilie über den hypothesengesteuerten Nachweis von PPI insbesondere mit möglichen Asthma-relevanten Interaktionspartnern. Es gelang (1) der Nachweis einer Homo- und Heterooligomerisierung der ORMDL-Proteine, (2) die Charakterisierung eines ORMDL-Interaktoms über die Untersuchung von mehr als 450 PPI mit der Identifikation neuer und möglicherweise pathogenetisch relevanter PPI und (3) die nähere Charakterisierung der Interaktion von ORMDL3 mit dem  $\beta_2$ -AR in Abhängigkeit vom Allelstatus des  $\beta_2$ -AR sowie unter dem Einfluss von  $\beta$ -Sympathomimetika.

### 4.1 Relevanz der ORMDL Homo- und Heterooligomerisierung

Dass die ORMDL-Proteine miteinander interagieren, ließ sich aufgrund der bekannten PPI zwischen ORM1 und ORM2 in *Saccharomyces cerevisiae* bereits vermuten (Hjelmqvist u. a. 2002). Aus der gleichen Arbeit war auch bekannt, dass ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 in menschlichen Geweben ubiquitär exprimiert werden. In Rahmen dieser Dissertation konnte nun gezeigt werden, dass ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 tatsächlich Homo- und Heterooligomere bilden. Dieser Nachweis gelang mit zwei unterschiedlichen Methoden *in vitro* (Co-IP und BRET) und ist Teil der Publikation von Toncheva und Kollegen (2015). Der Nachweis der Homo- und Heterooligomerisierung der ORMDL-Varianten wurde im gleichen Jahr auch durch Kiefer und Kollegen mittels der verwandten Methode Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) geführt (Kiefer u. a. 2015).

Die Oligomerisierung aller drei bekannten humanen ORMDL-Proteine lässt vermuten, dass sie ihre Funktion in höhermolekularen Komplexen ausüben, wobei es sich sowohl um Dimere als auch um komplexere Oligomere handeln könnte. Eine mögliche funktionelle Relevanz solcher Oligomere der ORMDL-Proteine wurde ebenfalls durch Kiefer und Kollegen aufgezeigt: während der Knockout der ORMDL-Proteine



zu einer signifikanten Erhöhung der totalen Ceramidproduktion führte (durch eine erhöhte SPT1-Aktivität), hatte die Überexpression einzelner ORMDL-Varianten keinen Einfluss auf die Menge an Ceramid. Wurden jedoch alle drei ORMDL-Varianten zugleich überexprimiert, so ergab sich eine vollständige Blockade der Ceramidproduktion. Die ORMDL-Proteine übten hier also ihren negativen regulatorischen Einfluss nur gemeinsam aus (Kiefer u. a. 2015).

Wir konnten wiederum in unseren BRET-Experimenten nachweisen, dass die Hetero- im Vergleich zur Homooligomerisierung mit gleich großer oder sogar erhöhter Neigung erfolgt. So war die Affinität ( $BRET_{50}$ ) von ORMDL2/ORMDL3 und ORMDL2/ORMDL1, Heterooligomere zu bilden, signifikant höher als für die jeweiligen Homooligomere von ORMDL2 oder ORMDL3. Dies kann bedeuten, dass die ORMDL-Proteine nicht unabhängig voneinander agieren, sondern in variierenden Kombinationen der einzelnen ORMDL-Varianten und zugleich andere Proteine insbesondere der Membran des ER eingebunden sind (Kapitel 4.2). Aus einer Bildung von heterooligomeren Komplexen folgt theoretisch auch, dass Polymorphismen, die die Expression einer der ORMDL-Varianten verändern, einen Einfluss auf die Funktion aller in der Zelle vorhandenen ORMDL-Proteine haben könnten (Toncheva u. a. 2015), auch wenn dies in der Sphingolipidsynthese nicht der Fall zu sein scheint. Dies ist bedeutsam, denn die mit Asthma assoziierten Polymorphismen liegen alle außerhalb der Protein-codierenden ORMDL-Gensequenzen und üben einen Einfluss auf das ORMDL-Expressionsniveau aus, verändern jedoch nicht die ORMDL-Proteine *per se* (Schedel u. a. 2015, Toncheva u. a. 2015). Durch eine veränderte Expression der ORMDL-Proteine abhängig vom Allel-Status kann es somit, unter Berücksichtigung der gezeigten unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der ORMDL-Heterooligomere kommen, die sich zudem nach einem Allergenkontakt nochmals verändern kann. Eine veränderte Zusammensetzung der Heterooligomere kann wiederum einen Einfluss auf eine mögliche ORMDL-Funktion etwa in der UPR oder der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten haben. Dass die Allergenexposition die Expression von ORMDL3 besonders in eosinophilen Granulozyten verändert, konnte bereits durch Ha und Kollegen gezeigt werden. In unstimulierten murinen Lungenschnitten wurde ORMDL3 mittels Immunhistochemie besonders in bronchialen Epithelzellen nachgewiesen. In Lungenschnitten nach Stimulation mit einem Allergenextrakt aus *Alternaria alternata* hingegen wurde ORMDL3 zudem in Immunzellen sowie mit insgesamt erhöhter Expression nachgewiesen (Ha u. a. 2013). In einer quantitativen PCR-Analyse konnte nach Allergenstimulation ebenfalls in murinen Bronchiepithelzellen ein 127-facher Anstieg der ORMDL3 mRNA-Menge gezeigt werden, während ORMDL2 nur 15-fach stärker exprimiert wurde und sich für die ORMDL1 mRNA keine Veränderung zeigte (Miller u. a. 2012). Die Allergen-induzierte Expression von ORMDL3 konnte jedoch nur in Epithelzellen, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten gezeigt werden, nicht aber in neutrophilen Granulozyten (Miller u. a. 2012). In Mastzellen wurde sogar eine Antigen-induzierte Herabregulation der ORMDL3-Expression nachgewiesen (Bugajev u. a. 2015). Ein wichtiger nachgewiesener Unterschied zwischen eosinophilen und neutrophilen Granulozyten ist, dass neutrophile Granulozyten besonders ORMDL2 expri-

mieren, während eosinophile Granulozyten vor allem ORMDL3 exprimieren (Ha u. a. 2013, Miller u. a. 2012). Dies bedeutet letztendlich, dass die Homo- und Heterooligomere von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 in den verschiedenen Zelltypen, insbesondere in eosinophilen bzw. neutrophilen Granulozyten, unterschiedlich konfiguriert sein müssen. Darüber hinaus konnten für die ORMDL-Proteine distinktive Expressionsmuster bei Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern als Antwort auf eine Stimulation des Immunsystems nachgewiesen werden. In Immunzellen des Bluts waren die mRNA-Expressionsniveaus für ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 bei Asthmatikern konstitutiv stark erhöht, während es nach einer Allergenexposition verglichen mit Nicht-Asthmatikern zu einem signifikant geringeren weiteren Anstieg kam (Toncheva u. a. 2015). Sechs Polymorphismen (rs5742940 (ORMDL1), rs7954619 (ORMDL2), rs8079416, rs4795405, rs12603332 und rs3902920 (ORMDL3)) wurden untersucht, um ihren Einfluss auf die Expression des jeweiligen ORMDL-Proteins zu erfassen. Das Risikoallel 'C' des Polymorphismus rs8079416 war assoziiert mit einer signifikant erhöhten ORMDL3-Expression in mit Allergenen stimulierten und unstimulierten Immunzellen von Asthmatikern. Für das Allel 'T' des Polymorphismus rs4795405, das nicht als Risikoallel für Asthma bekannt ist, konnte hingegen eine signifikant reduzierte Expression von ORMDL3 nach Allergenexposition gezeigt werden. Auch für das Risikoallel 'A' des Polymorphismus rs5742940 zeigte sich eine erhöhte ORMDL1-Expression nach der Stimulation mit einem Allergen. Für den ORMDL2-Polymorphismus rs7954619 ließ sich hingegen gar kein Effekt auf die ORMDL2-Expression finden (Toncheva u. a. 2015). Zusammenfassend deuten die bisherigen Studien zur Expression von ORMDL-Proteinen darauf hin, dass die ORMDL-Proteine in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Maß exprimiert werden, dass sie unterschiedlich auf eine Allergen-Stimulation reagieren und dass diese Unterschiede im Expressionsniveau der ORMDL-Proteine zugleich die Grundlage für ein erhöhtes Asthmarisiko in Abhängigkeit vom Allelstatus bilden könnten.

Während die genaue Struktur der höhermolekularen ORMDL-Komplexe nun in weiteren Studien aufgeklärt werden muss, ist auch allein der Nachweis, dass die ORMDL-Proteine Homo- und Heterooligomere bilden, bedeutsam. Es ist bekannt, dass die Oligomerisierung von Proteinen zu einer stabileren Konfigurationen führen, die Komplexität möglicher Konformationsänderungen erhöhen, sowie die Zahl der Bindungsstellen für spezifische PPI vergrößern kann (Ispolatov u. a. 2005). Proteine, die Homodimere bilden, haben im Durchschnitt doppelt so viele Interaktionspartner, und im Umkehrschluss ist die Wahrscheinlichkeit, die Homodimerisierung eines Proteins nachzuweisen, proportional zur Anzahl der für dieses Protein bekannten PPI (Ispolatov u. a. 2005).

Zusammenfassend konnte bezüglich der Homo- und Heterooligomerisierung gezeigt werden, dass alle drei ORMDL-Proteine miteinander und mit sich selbst interagieren. Diese Ergebnisse sind Teil einer Publikation, in der zudem durch Antoaneta Toncheva aus der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Kabesch, Abteilung Pädiatrische Pneumologie und Allergologie in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg, nachgewiesen werden konnte, dass auch Polymorphismen der Promotorregionen von ORMDL1 und ORMDL2 eine Assoziation mit der

Erkrankung an Asthma bronchiale im Kindesalter aufweisen (Toncheva u. a. 2015).

## 4.2 Das erweiterte ORMDL-Interaktom

Bei der Untersuchung des ORMDL-Interaktoms war ein Ziel die Identifikation von Hinweisen auf mögliche bisher unbekannte Funktionen von ORMDL, um Erklärungsansätze für den Zusammenhang zwischen höherer ORMDL-Expression und der Erkrankung an Asthma im Kindesalter zu entwickeln. Entsprechend wurden verschiedene Vorgehensweisen gewählt, um neue Interaktionspartner der ORMDL-Proteine zu identifizieren.

Für eine ähnliche biologische sowie evolutionär konservierte Funktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 sprachen die hohe Sequenzhomologie von 80-84 % (Hjelmqvist u. a. 2002), der fehlende Einfluss eines Gen-Knockouts von entweder *ORM1* oder *Orosomucoid 2 (ORM2)* auf die Zellfunktion in *Saccharomyces cerevisiae* und die Möglichkeit, die Folgen einer gleichzeitigen Deletion von *ORM1* und *ORM2* in *Saccharomyces cerevisiae*, die zu einem deutlich verlangsamtem Zellwachstum und einer erhöhter Sensibilität auf zahlreiche Zellgifte führt, durch die Transfektion von humanem ORM-ähnliches Protein 3 (ORMDL3) teilweise aufzuheben (Hjelmqvist u. a. 2002). Eine weitere Bestätigung für die These, dass die unterschiedlichen ORM- und ORMDL-Proteine ähnliche Funktionen ausüben, ist ein Ergebnis dieser Dissertation, denn in mehr als 450 getesteten Interaktion verhielten sich ORMDL1, ORMDL2 bzw. ORMDL3 mit nur vier Ausnahmen gleichartig: Entweder interagiert jede oder keine der ORMDL-Varianten mit einem potenziellen Interaktionspartner. Das explorative Interaktom für ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 ist somit fast vollständig identisch. Der Aufbau dieses Interaktoms sowie mögliche ORMDL-Funktionen sollen im Folgenden besprochen werden.

Wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben übertrugen wir in einem ersten Schritt bekannte PPI von *ORM1* und *ORM2* in *Saccharomyces cerevisiae* durch die Untersuchung humaner Homologe auf die ORMDL-Proteine. Neben der Homo- und Heterooligomerisierung der ORMDL-Varianten (4.1) konnten wir auf diese Weise vier neue Interaktionspartner der ORMDL-Proteine identifizieren: DDOST, CYP51A1, NSDHL und MSMO1. Auffällig ist, dass sowohl CYP51A1 als auch NSDHL und MSMO1 im Fettstoffwechsel involviert sind.

### 4.2.1 Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und der Sphingolipidbiosynthese

Dass der Ansatz vielversprechend ist, in einem Organismus zunächst PPI aufspüren, um davon ausgehend Proteinfunktionen zu identifizieren, zeigen die Arbeiten von Breslow und Kollegen und Han und Kollegen zur ORM-Funktion. Die Hypothesen bezüglich einer ORMDL-Funktion in der Sphingolipidbiosynthese wurden ausgehend von den bekannten Interaktionen zwischen ORM und Serin Palmitoyltransferase LCB Untereinheit 1 (LCB1) entwickelt (Breslow u. a. 2010, S. Han u. a. 2010). Für ORM konnte in

*Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass es eine entscheidende Rolle spielt in der Sphingolipidbiosynthese (Breslow u. a. 2010, S. Han u. a. 2010) durch die Suppression der Funktion der Serin-Palmitoyl-Coenzym A Transferase (SPT, in *Saccharomyces cerevisiae* mit LCB1 benannt) (Levy 2013). Der Nachweis dieses Regulationsmechanismus auch in humanen Zellen steht jedoch noch aus (Kiefer u. a. 2015). Dass die Inhibition von SPT in Mäusen einen Asthmaphänotyp mit bronchialer Hyperreagibilität induzieren kann, ohne jedoch eine bronchiale Inflammation auszulösen oder zu anderen Mechanismen der Asthmapathogenese wie vermehrter Produktion von Mucus und dem *remodeling* der Atemwege beizutragen, konnte bereits gezeigt werden (Worgall u. a. 2013). Wir konnten nachweisen, dass auch die in der Cholesterinbiosynthese involvierten Proteine CYP51A1, NSDHL und MSMO1 mit den ORMDL-Proteinen interagieren. Die bekannte Interaktion (Breslow u. a. 2010, Kiefer u. a. 2015) von ORMDL3 mit SPTLC1 konnte mittels BRET und Co-IP bestätigt werden. Es gelang zudem der erstmalige Nachweis einer Interaktion auch von ORMDL1 und ORMDL2 mit SPTLC1. Diese Ergebnisse sind Teil der Publikation von Toncheva und Kollegen (Toncheva u. a. 2015) und vereinbar mit den vorgestellten Studien zum Zusammenhang zwischen dem Fettstoffwechsel und einer möglichen ORMDL-Funktion.

#### 4.2.2 Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und Chaperonen, der Unfolded-Protein-Response und dem Calciumstoffwechsel

Bereits bei Erstbeschreibung der ORM- und ORMDL-Proteine wurde eine Funktion dieser Proteinfamilie in der UPR vermutet, abgeleitet aus der Beobachtung, dass Hefezellen ohne ORM1 und ORM2 besonders sensibel auf die Zellgifte Tunicamycin und DTT reagieren, die über eine Störung der Proteinfaltung mit Akkumulation ungefalteter und fehlgefalteter Proteine im ER die UPR auslösen und Chaperone aktivieren (Hjelmqvist u. a. 2002). Das ER, in dem die ORMDL-Protein lokalisiert sind, geht von der Membran des Nukleus aus und erstreckt sich in das Zytosol aller eukaryotischen Zellen. Es ist ein membranbegrenztes Netzwerk aus zahlreichen Tubuli und Aussackungen und vor allem der Ort, an dem die Biosynthese und Proteinfaltung zahlreicher löslicher sowie membrangebundener Proteine stattfindet. Ungefähr ein Drittel aller neu synthetisierten Proteine wird über die Membran des ER in sein Lumen transloziert, wo sie mit Hilfe von Chaperonen ihre korrekte dreidimensionale Konformation annehmen, bevor sie mit Hilfe weiterer Chaperone in das korrekte Zellkompartiment verschoben werden (*trafficking*) (J. Zhang u. a. 2008). DDOST als Interaktionspartner der ORMDL-Proteine hat eine Funktion in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen im ER bei der Übertragung von Oligosacchariden auf neu entstehende Polypeptidketten (Kumar u. a. 1998). Wir konnten in unseren Interaktionsexperimenten mittels BRET zahlreiche weitere Interaktionen der ORMDL-Proteine mit wichtigen Chaperonen des ER nachweisen, und zwar von der Aufnahme in das ER über die korrekte Proteinfaltung bis hin zum *trafficking*: Die ORMDL-Proteine interagieren mit in der Translokation von neu-

synthetisierten Polypeptidketten in das ER wichtigen Proteinen wie SEC61A1 (Lang u. a. 2012) oder SSR1 (Hartmann u. a. 1994). Sie interagieren mit Chaperonen wie Calnexin (CANX) oder Calreticulin (CALR), die eine zentrale Rolle in der Qualitätskontrolle der Proteinsynthese ausüben (Gelebart u. a. 2005, Hetz u. a. 2011, Malek u. a. 2010) und weiterhin mit solchen Proteinen, die ebenso wie DDOST an der posttranslationalen Modifikation der Polypeptidketten teilhaben wie ZDHHC3, das als ER-Membranprotein mit Palmitoyltransferaseaktivität die Übertragung von Palmitinsäure auf Cysteinreste von Proteinen katalysiert, die der besseren Lipidverankerung von Membranproteinen (Bijlmakers u. a. 2003) dienen, und LMAN2, das mannosereiche Glycoproteine kontrolliert (Reiterer u. a. 2010). Schließlich interagieren sie mit am *trafficking* beteiligten Proteinen wie GOS2R (Lowe u. a. 1997), SEC22B (Hay u. a. 1997) oder FKBP1A (DiLella 1991) sowie zugleich mit ER-Ankerproteinen, die ein *trafficking* verhindern können wie KDELR2 und KDELR3 (Pelham 1996). Das Stress-assoziierte ER-Protein 1 (SERP1) kann in Situationen von ER-Stress neu synthetisierte Membranproteine stabilisieren und vor der Degradation im Rahmen der UPR schützen (Yamaguchi u. a. 1999). Es interagiert ebenfalls mit ORMDL. Die ORMDL-Proteine haben entsprechend Kontakt zu ER-Chaperonen auf allen Ebenen der posttranslationalen Proteinmodifikation. Natürlich kann durch reine PPI-Experimente weder ausgeschlossen werden, dass die Interaktionspartner nur an der korrekten Faltung und Lokalisation der ORMDL-Proteine teilhaben, noch bewiesen werden, dass die ORMDL-Proteine ihre Funktion beeinflussen.

Wenn es innerhalb einer Zelle nicht gelingt, größere Mengen anfallender un- oder fehlgefalteter Proteine zum Beispiel im Rahmen einer Situation mit erhöhtem zellulären Stress korrekt zu verarbeiten und es dadurch zu einem Ungleichgewicht zwischen den Anforderungen an das ER und seiner Kapazität mit Akkumulation fehlgefalteter Proteine kommt, wird die UPR aktiviert (J. Zhang u. a. 2008). Bei der UPR handelt es sich um ein zelluläres Programm, das über die Aktivierung verschiedener Signalwege eine Wiederherstellung des Gleichgewichts im ER anstrebt. Diese Prozesse sind nicht nur in Ausnahmesituationen wichtig: so führt beispielsweise schon die Differenzierung einer B-Zelle zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle zur Aktivierung der UPR (Calfon u. a. 2002). In der UPR wird veranlasst, dass die Produktion neuer sekretorischer Proteine verlangsamt wird, während vermehrt Chaperone exprimiert und fehlgefaltete Proteine über die ER-assoziierte Degradation (ERAD) eliminiert werden. Sogar die Größe des ER kann zunehmen, um die Konzentration der ungefalteten Proteine im Lumen zu verringern (J. Zhang u. a. 2008). Sind diese Maßnahmen jedoch nicht erfolgreich, so breitet sich der ER-Stress entlang des sekretorischen Pfades in der Zelle aus, führt zur zellulären Dysfunktion und schließlich zur Einleitung der Apoptose (Schröder u. a. 2005, J. Zhang u. a. 2008). Ausgelöst werden die UPR-Signalkaskaden über je einen von drei verschiedenen Proteinsensoren: PERK, IRE1 $\alpha$  oder ATF6 (J. Zhang u. a. 2008). In ruhenden Zellen werden alle drei Sensoren in einem inaktiven Zustand gehalten durch die Bindung an BIP (auch HSPA5), das bei zunehmendem ER-Stress stattdessen an fehlgefaltete Proteine gebunden wird und so die „Sensoren“ freigibt (J. Zhang u. a. 2008). Wir konnten nachweisen, dass BIP nicht mit den ORMDL-Proteinen interagiert. Ob die ORMDL-Varianten hingegen mit IRE1 $\alpha$ , PERK oder ATF6 direkt interagieren, ist nicht bekannt, da sie in

dem von uns untersuchten Interaktom nicht enthalten waren. Dies gilt auch für eine Interaktion mit ROS, JNK sowie NF $\kappa$ B, die als Folge der UPR eine Inflamationsreaktion auslösen können (J. Zhang u. a. 2008). Für die in der UPR-Signalkaskade nachgeordneten Proteine wie die Gruppe der Hitzeschockproteine (HSPA9B, HSPD1, HSP90AB1), die DnaJ-Proteinfamilie (DNAJB9, DNAJB11) oder das X-Box-bindende Protein 1 (XBP1) konnten wir hingegen zeigen, dass sie nicht mit ORMDL1, ORMDL2 oder ORMDL3 interagieren. Ob ORMDL3 einen funktionellen Einfluss auf die UPR-Signalkaskade hat, ist nicht sicher und könnte sich von Zelllinie zu Zelllinie unterscheiden (Hsu u. a. 2013). Miller und Kollegen konnten zeigen, dass ORMDL3 in Lungenepithelzellen selektiv ATF6 aktiviert (Miller u. a. 2012). Cantero-Recasens und Kollegen hingegen konnte nachweisen, dass eine höhere ORMDL-Expression zu den PERK-abhängigen Veränderungen einer stärkeren eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und einer höheren BIP- und EGR-1-Expression in Jurkat und HEK293-Zellen führt (Cantero-Recasens u. a. 2009). Hsu und Kollegen konnten in alveolären Epithelzellen keinen Effekt einer ORMDL3-Überexpression oder eines ORMDL3-Knockouts auf die UPR beobachten und kamen zu dem Schluss, dass ORMDL3 nicht die UPR beeinflusst (Hsu u. a. 2013). Mittlerweile ist die Expression von ORMDL3 dennoch bereits als Marker für die UPR infolge von oxidativen und endoplasmatischem Stress verwendet worden (Kajimoto u. a. 2014). Ob eine höhere ORMDL3-Expression tatsächlich in dieser Weise als Indikator verwendet werden kann und zuverlässig eine UPR anzeigt, ist jedoch nicht sicher. Unsere Untersuchungen zum ORMDL-Interaktom sind leider nicht vollständig genug, um die Beteiligung der ORMDL-Proteine an der Auslösung der UPR einschätzen zu können, wir fanden jedoch keine Interaktion mit Proteinen der UPR-Signalkaskade unterhalb von PERK, IRE1 $\alpha$  oder ATF6.

Die UPR kann nicht nur durch eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine aktiviert werden, sondern auch durch hohe Calciumspiegel in der Zelle bzw. niedrige Calciumspiegel im ER (Cantero-Recasens u. a. 2009, J. Zhang u. a. 2008). Das ER fungiert als ein dynamischer Calciumspeicher, der bei Stimulation durch Hormone, Inflamationsreaktionen oder andere Botenstoffe Calcium ausschütten kann, um Calcium-abhängige Signalkaskaden auszulösen (Berridge u. a. 2000) und ist somit unentbehrlich für die Calcium-vermittelten Signalwege. Calcium-Pumpen wie SERCA sorgen für die Wiederaufnahme von Calcium in das ER, füllen also den Speicher wieder auf. Dass ORMDL3 hier einen Einfluss ausübt, konnte durch Cantero-Recasens und Kollegen gezeigt werden. Sie wiesen nach, dass ORMDL3 direkt mit SERCA2b interagiert und eine Überexpression von ORMDL3 dadurch die Menge an Calcium im ER signifikant reduziert, während ein Ausschalten von ORMDL3 die Calcium-abhängigen Signalkaskaden verstärkt durch einen höheren Calciumspiegel im ER (Cantero-Recasens u. a. 2009). Sie konnten außerdem zeigen, dass eine ORMDL3-Überexpression zur Aktivierung der UPR über den PERK-Signalweg führt, am ehesten ausgelöst durch die niedrigere ER-Calciumkonzentration (Cantero-Recasens u. a. 2009). Wir konnten die Interaktion von ORMDL3 mit SERCA2 bestätigen und für ORMDL1 und ORMDL2 erstmals zeigen. Weiterhin konnten wir zeigen, dass ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit den Calcium-abhängigen Chaperonen Calnexin (CANX), Calreticulin (CALR) und dem S100 Calcium-bindenden Protein

A8 (S100A8) interagieren. Neben seiner Funktion als ER-Chaperon dient Calreticulin auch als wichtigster Calciumspeicher im ER (Michalak u. a. 2002). Die ORMDL-Proteine interagieren hingegen nicht mit PDIA3 (auch als ERp57 bezeichnet), das mit Calreticulin und Calnexin einen funktionellen Komplex bildet (Michalak u. a. 2002). Calnexin und Calreticulin sind weitgehend identisch, abgesehen von der Transmembrandomäne des Calnexins und dem C-terminalen Calciumspeicher des Calreticulins (Michalak u. a. 2002). Über die Interaktion mit diesen beiden wichtigsten ER-Chaperonen könnten die ORMDL-Proteine einen Einfluss auf die Proteinfaltung sowohl von Membranproteinen als auch von löslichen Proteinen ausüben. Dass Calreticulin die ORMDL-Proteine hingegen selbst als Chaperon bindet, um ihre korrekte Faltung zu katalysieren, erscheint aufgrund ihrer Lokalisation in der ER-Membran unwahrscheinlich (Michalak u. a. 2002). Zusammenfassend konnten wir (bei 26 untersuchten potenziellen Interaktionspartnern) insgesamt 16 neue PPI von ORMDL mit relevanten Chaperonen nachweisen. Die Hypothese einer ORMDL-Funktion im ER bei der Proteinfaltung, im *trafficking* und im Calcium-Stoffwechsel (und damit möglicherweise auch in der UPR) wird durch die von uns nachgewiesenen neuen PPI gestützt.

#### 4.2.3 Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und dem Immunsystem

Seitdem ORMDL-Funktionen in der Sphingolipidbiosynthese sowie im Calciumstoffwechsel bekannt sind, wird nach einem Zusammenhang zwischen diesen Prozessen und der Asthmapathogenese gesucht. Cantero-Recasens und Kollegen als Erstbeschreiber einer Funktion von ORMDL3 in der Calciumhomöostase des ER führten den Zusammenhang einer erhöhten ORMDL3-Expression mit einem erhöhten Risiko, an Asthma zu erkranken, darauf zurück, dass ORMDL3 über den Calciumstoffwechsel die UPR auslösen kann und die UPR wiederum zelluläre Inflammationsmechanismen aktivieren könnte (Cantero-Recasens u. a. 2009). Die Erstbeschreiber der ORM-Funktion in der Sphingolipidbiosynthese waren vorsichtig in der Interpretation ihrer Ergebnisse im Bezug auf die Asthmapathogenese: Breslow und Kollegen meinten, dass aus ihren Ergebnissen die zu überprüfende Hypothese einer kausalen und direkten Rolle der fehl-regulierten Sphingolipidhomöostase bei der Entwicklung von Asthma bronchiale folge (Breslow u. a. 2010), während Han und Kollegen keinen Zusammenhang zwischen ihren Ergebnissen und der Asthmapathogenese herstellten (S. Han u. a. 2010).

Auf der Suche nach einer direkteren Verbindung zwischen Asthmapathogenese und ORMDL-Funktion untersuchten wir die Interaktion von immunologisch relevanten Proteinen mit den ORMDL-Varianten, da es sich bei Asthma bronchiale in erster Linie um eine inflammatorische Erkrankung der Atemwege handelt. Auf der Basis von Relevanz und Verfügbarkeit wurden die folgenden Proteine ausgewählt: CCL11, CCR3, CCR4, CCR6, IL2RB, IL2RG, IL10RB, IL12RB1, IL17RA, IL21R, IL23R, RORC, STAT1, STAT3, STAT4, STAT5B und STAT6. Wir konnten sechs bisher unbekannte PPI nachweisen, wobei es sich um die erste Beschreibung einer direkten Interaktion von ORMDL1,

ORMDL2 und ORMDL3 bei der Asthmapathogenese relevanten Membranrezeptoren handelt. Die positiven Interaktionspartner der ORMDL-Proteine waren die in der TH2-Immunantwort relevanten Rezeptoren IL2RB, IL12RB1 und IL10RB sowie die in der Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten relevanten Rezeptoren CCR3, CCR4 und CCR6.

Die Entzündungsreaktion der Atemwege ist ein multizellulärer Prozess, der eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, CD41+T-Lymphozyten und Mastzellen involviert, besonders aber durch die eosinophile Gewebeeinfiltration gekennzeichnet ist (Holgate 2008). Für die Asthmapathogenese wird angenommen, dass eine Th2-Immunantwort vorliegt (Fahy 2015, Holgate 2008). Eine Th1-Immunantwort ist gekennzeichnet durch CD4+ Th1-Helferzellen, die besonders IL-2, Interferon- $\gamma$  und Lymphotoxin- $\alpha$  ausschütten und so eine zelluläre Immunantwort auslösen, die durch Phagozytose gekennzeichnet ist (Fahy 2015). Eine Th2-Immunantwort hingegen beruht eher auf der Ausschüttung von IL-4, IL-5 und IL-13 durch Th2-Helferzellen und ist durch hohe Antikörpertiter und eine Eosinophilie gekennzeichnet (Fahy 2015). Die Th2-Helferzellen sind durch die Expression von CCR4 charakterisiert (Campbell u. a. 2000). Wir konnten eine Interaktion aller ORMDL-Proteine mit CCR4 nachweisen. CCR4 ist zudem ein Ziel zahlreicher neuer Asthmamedikamente, die auf eine Elimination der Th2-Zellen abzielen (Catley u. a. 2011, Garcia u. a. 2005, Pease u. a. 2014).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die intranasale Applikation der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 in Mäusen zur Induktion einer 127-fach höheren ORMDL3 und 15-fach höheren ORMDL2 Expression führt, nicht aber von ORMDL1 (Miller u. a. 2012). Diese Induktion wird über STAT6 vermittelt (Miller u. a. 2012), das in unseren BRET-Experimenten nicht mit ORMDL interagiert. Durch Ha und Kollegen konnte eine Hochregulation der ORMDL3 Expression durch IL-3 gezeigt werden, nicht jedoch durch IL-5 (Ha u. a. 2013). Die Rezeptoren dieser Interleukine sind in unserer Auswahl nicht berücksichtigt worden. Wir waren nur in der Lage, eine Interaktion der ORMDL-Proteine mit den Rezeptoren IL2RB, IL12RB1 und IL10RB zu zeigen. Für das Th1-Zytokin IL-2 ist bekannt, dass es zur Aufrechterhaltung einer bereits eingeleiteten Th2-Immunantwort beitragen kann (Holgate 2008). Dies gilt ebenfalls für IL-12 (Holgate 2008, Wills-Karp 1998). Sowohl IL-2 als auch IL-12 sind dennoch als Therapeutika für Asthma in Tierstudien eingesetzt worden, um über die Induktion einer Th1-Immunantwort die Th2-Immunantwort einzuschränken (Leonard u. a. 2003). Auch für das anti-inflammatorische IL-10 konnte bereits gezeigt werden, dass es bei höherer Expression protektiv gegenüber einer Erkrankung an Asthma bronchiale wirken kann (Böhm u. a. 2015, Boehler u. a. 2014) beziehungsweise bei fehlerhafter Expression eine Erkrankung begünstigt (Gupta u. a. 2014). Mithin vermitteln alle drei Interleukin-Rezeptoren, für die wir mittels BRET eine Interaktion mit den ORMDL-Proteinen nachweisen konnten, eher einen protektiven Effekt im Zusammenhang mit Asthma. Wir fanden keinen Hinweis darauf, dass die ORMDL-Proteine mit in der Signaltransduktion dieser Rezeptoren über die STAT-Proteine beteiligt sind. Um die Bedeutung von ORMDL3 in der Th2-Immunantwort zu klären, wäre es jedoch zum einen wichtig, das Interaktom um einige wichtige Rezeptoren (u.a. für IL-3, IL-4, IL-5 und IL-13) zu ergänzen, und zum anderen die mit einer ORMDL3-Überexpression



assoziierten Endophänotypen von Asthma zu bestimmen (Fahy 2015). Letztendlich ist die Aussagekraft der gefundenen Interaktionen bezüglich der Th2-Immunantwort daher noch gering.

Interessant ist, ob der Locus 17q21 mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an Endophänotypen des moderaten und schweren Asthmas assoziiert ist, die mit einer über neutrophile Granulozyten und Th17-Zytokine vermittelten Immunantwort einhergehen (Newcomb u. a. 2013). Der IL-17 Rezeptor (Untereinheiten IL17RA und IL17RC) soll über Mechanismen wie Mukussekretion, Reaktivität der glatten Muskelzellen und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die abhängig sind von einer TH17 T-Helferzellaktivierung, in der Asthmapathogenese involviert sein (Chesne u. a. 2014, Lindén u. a. 2014, Newcomb u. a. 2013, Silverpil u. a. 2012, Y.-H. Wang u. a. 2011). Zudem gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer ORMDL3-Überexpression und einer stärkeren Sekretion von IL-17 (Lluis u. a. 2011). Miller und Kollegen konnten keinen Einfluss von ORMDL3 auf neutrophile Granulozyten (im Gegensatz zu eosinophilen Granulozyten) zeigen (Miller u. a. 2012), und auch in unseren BRET-Experimenten interagierten die ORMDL-Proteine nicht mit den für eine Th-17-Zelldifferenzierung wichtigen Rezeptoren IL17RA, IL21R und IL23R. Eine Interaktion mit IL17RC konnten wir aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nicht untersuchen.

Dass eosinophile Granulozyten in der Asthmapathogenese eine bedeutende Rolle spielen, darf als gesichert gelten (Holgate 2008). So lassen sie sich in großer Zahl im Sputum und den Atemwegen von schlecht Symptom-kontrollierten Asthmatikern und nach Exazerbationen nachweisen, während Kortisol ihre Anzahl drastisch reduziert (Djukanovic u. a. 1997, Holgate 2008). Die CD34-Vorläuferzellen der eosinophilen Granulozyten werden durch IL-3, GM-CSF und die Eotaxine 1-3 zur Differenzierung angeregt, während IL-5 und wiederum die Eotaxine 1-3 zur Migration an den Ort der Entzündung in den Atemwegen beitragen (Holgate 2008). Ein überzeugender Zusammenhang zwischen der ORMDL3-Expression und der Funktionsfähigkeit eosinophiler Granulozyten wurde durch Ha und Kollegen gefunden. Eosinophile Granulozyten in der Allergen-exponierten Maus exprimieren ORMDL3 in der Lunge. Diese Expression von ORMDL3 wird durch IL-3 und Eotaxin-1 induziert. Eosinophile Granulozyten, die ORMDL3 exprimieren, zeigen u.a. ein verändertes Verhalten mit einem verstärkten *rolling* und einer höheren Expression von CD48. ORMDL3-Knockout-Zelllinien hingegen, denen ORMDL3 vollständig fehlt, haben eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung, zur Adhäsion und zur Migration in inflammatorisch verändertes Gewebe (Ha u. a. 2013). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ORMDL3 das *trafficking*, die Rekrutierung und die Degranulation eosinophiler Granulozyten reguliert (Ha u. a. 2013). Entsprechend unserem BRET-Experiment interagiert Eotaxin-1 CCL11 (Williams 2015) möglicherweise direkt mit ORMDL2, nicht aber mit ORMDL1 oder ORMDL3. Die CCL11-Sputumkonzentration ist als potenzieller Biomarker für die Diagnose und Verlaufsbeurteilung des Schweregrades von Asthma bronchiale vorgeschlagen worden (D. Wu u. a. 2014). CCL11 fungiert als Chemotaxin in der Rekrutierung von Eosinophilen, die den Rezeptor CCR3 tragen, in das Gewebe und ist somit an allen eosinophilen allergischen Reaktionen beteiligt (Jose u. a. 1994, Ponath u. a. 1996). Für diesen und zwei

weitere wichtige Chemokinrezeptoren (CCR3, CCR4, CCR6) der eosinophilen Granulozyten konnten wir eine direkte Interaktion mit ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 nachweisen. Die sich abzeichnende Assoziation zwischen ORMDL3-Expression und Funktionsfähigkeit der eosinophilen Granulozyten wird durch diese erstmals nachgewiesenen PPI gestützt. Aber auch hier ist es wichtig zu klären, ob der Locus 17q21 überhaupt mit einem erhöhten Risiko für den Endophänotyp des eosinophilen Asthmas assoziiert ist (Fahy 2015).

Schließlich gelang in den BRET-Experimenten noch der Nachweis einer Interaktion der ORMDL-Proteine mit dem Rezeptor PAR2. Für Agonisten dieses Rezeptors, wie die durch Mastzellen ausgeschüttete Trypsin, ist bekannt, dass die Proliferation von glatten Muskelzellen der Atemwege stimulieren - einer der wichtigsten Mechanismen des *remodeling* der Atemwege (Berger u. a. 2001).

Zusammenfassend haben wir hier erstmalig eine direkte Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit einigen in der Asthmapathogenese relevanten Membranrezeptoren nachgewiesen, auch wenn offensichtlich die Untersuchung der Interaktion von ORMDL mit weiteren wichtigen Rezeptoren (z. B. für IL-4, IL-5 oder IL-13) aussteht. Die Auswahl der 17 durch uns untersuchten Proteine bietet nur einen kleinen Einblick in die heterogene Asthmapathogenese, dennoch eröffnet sie die Möglichkeit, dass ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 unmittelbar in Inflammationsreaktion involviert sind. In Zusammenschau mit einer möglichen ORMDL-Funktion in der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen oder als Chaperon ist zum Beispiel eine Regulation der Oberflächenexpression von PAR2, IL2RB, IL12RB1, IL10RB, CCR3, CCR4 oder CCR6 ein denkbarer Pathomechanismus.

#### 4.2.4 Identifikation von ORMDL als Interaktionspartner anderer Membranproteine

Unter allen gegen die ORMDL-Proteine getesteten Membranproteinen (n=98) ließ sich für 42,9 % eine Interaktion mit den ORMDL-Proteinen nachweisen. Unter den ER-Membranproteinen (n=31) war dieser Anteil mit 77,4 % noch höher. Erstmals gelang im Rahmen dieser Dissertation der Nachweis, dass die ORMDL-Proteine mit G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) interagieren. Von 14 getesteten GPCR interagierten 13 (CCR3, CCR4, CCR6, ADORA3, ADORA2b,  $\beta_2$ -AR, CXCR1, CXCR2, CHRM3, CYSLTR1, PAR2, OPRD1, SSR1) mit allen ORMDL-Proteinen, einzig CXCR4 interagiert nicht mit ORMDL. Die ORMDL-Proteine interagieren entsprechend mit 92,8 % aller getesteten GPCR. Es zeigt sich eine gemeinsame Eigenschaft der ORMDL-Proteine, die die bisher dargestellten Verbindungen zu verschiedenen Pathomechanismen überschreitet. Einschränkung muss festgehalten werden, dass sich BRET als *in vivo*-Methode mit korrekter posttranslationaler Modifikation und subzellulärer Lokalisation der untersuchten Proteine zwar besonders zur Testung der PPI von Membranproteinen und Rezeptoren eignet (Pfleger u. a. 2005), jedoch die Möglichkeit bestehen bleibt, dass es sich um falsch

positive Interaktionen aufgrund der Anreicherung der Interaktionspartner in der Zellmembran handelt. Eine andere Deutungsmöglichkeit besteht in der Vermutung einer übergeordneten Funktion der ORMDL-Proteine zum Beispiel als akzessorisches Protein in der posttranslationalen Prozessierung von GPCR im ER im Rahmen der in Abschnitt 4.2.2 gezeigten Interaktion mit wichtigen Chaperonen. Hier sind weitere Experimente notwendig, um die Relevanz der Interaktionen zwischen den GPCR und ORMDL zu entschlüsseln. Die weiteren Experimente zur beispielhaft untersuchten Interaktion von ORMDL und  $\beta_2$ -AR werden in Kapitel 3.2 beschrieben.

#### 4.2.5 Bestätigung einer Verbindung zwischen ORMDL und dem $\gamma$ -Sekretase-Komplex

Bei der Untersuchung der Interaktion der ORMDL-Proteine mit den Proteinen des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes erwiesen sich sechs von sieben untersuchten Interaktionen als positiv. Für Nicastrin konnten wir die ursprüngliche Publikation von Araki und Kollegen (2007) bestätigen, denn es ließ sich keine Interaktion mit den ORMDL-Proteinen nachweisen, während für PSEN1 im Gegensatz zur Beschreibung durch Araki und Kollegen der Nachweis einer PPI gelang. Nur diese beiden Proteine waren zuvor auf eine Interaktion mit ORMDL1 getestet worden (Araki u. a. 2007). Araki und Kollegen haben darüber hinaus zeigen können, dass ORMDL unter der transkriptionellen Kontrolle von PS-1 steht und die Funktion des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes beeinflusst, und postuliert, dass die ORMDL-Proteine für die Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ bedeutsam sind. Durch unsere BRET-Experimente lässt sich nun erstmals eine direkte Interaktion der ORMDL-Proteinfamilie mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Komplex belegen. Eine Erklärung für eine Funktion der ORMDL-Proteine sowohl in der Alzheimer- als auch in der Asthmapathogenese steht jedoch aus. Es gibt allerdings bereits zahlreiche Studien, die eine Bedeutung des Fettstoffwechsels, der Cholesterinbiosynthese und der Sphingolipidhomöostase auch in der Pathogenese der Demenz vom Alzheimer-Typ belegen können (u.a. van Echten-Deckert u. a. 2012, Walter 2012, Walter u. a. 2013), sodass sich hier zahlreiche Möglichkeiten einer Überschneidung in den Pathomechanismen ergeben. Darüber hinaus gibt es epidemiologische Hinweise darauf, dass die Erkrankung an Asthma im mittleren Lebensalter tatsächlich das Risiko erhöht, im höheren Lebensalter an einer Demenz vom Alzheimer-Typ zu erkranken (Odds Ratio 2.62) (M.-H. Chen u. a. 2014, Rusanen u. a. 2013). Weiterhin gibt es eine einzelne Studie, in der das Asthmamedikament Cromoglicinsäure die Oligomerisierung von Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) reduzieren konnte (Hori u. a. 2015). In diesem Zusammenhang kann darauf verwiesen werden, dass es bei vielen Erkrankungen, für die ursächlich eine gestörte Sphingolipidhomöostase gezeigt werden konnte (Breslow u. a. 2010, G. Han u. a. 2009), zu einer Affektion des zentralen Nervensystems kommt, z. B. bei Morbus Fabry, Morbus Gaucher, der Niemann-Pick-Krankheit, Morbus Krabbe, dem Tay-Sachs-Syndrom oder der metachromatischen Leukodystrophie.

#### 4.2.6 Qualitätskontrolle des erweiterten ORMDL-Interaktoms

Als ein Beleg für die Spezifität der hier dargestellten neu identifizierten PPI von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 können die beiden Kontrollexperimente dienen: wir untersuchten zum einen die Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit 35 zufällig ausgewählten Proteinen (zufälliger Referenzdatensatz (*random reference set*), RRS), zum anderen die Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit allen bekannten peroxisomalen Proteinen. Nur ORMDL2 interagiert mit einem der zufällig ausgewählten Proteine, während alle anderen Interaktionsexperimente eine BRET-Ratio unterhalb des unteren Schwellenwertes (bzw. in zwei Fällen innerhalb des Graubereichs) ergaben, was die Relevanz der zahlreichen erstmals identifizierten und oben beschriebenen Interaktionspartner aus dem Bereich der UPR, des Immunsystems und des Fettstoffwechsels unterstreicht. Auch die wenigen gefundenen, peroxisomalen Interaktionspartner (18 % der überprüften Interaktionen waren positiv bei insgesamt 42 untersuchten Interaktionspartnern und bei einer zu erwartenden falsch-positiv Rate von 3 %) der ORMDL-Proteine weisen entweder eine Funktion mit Proteintrafficking auf (PEX13, PEX26, SLC25A17) (Gould u. a. 1996, Jones u. a. 2001, Weller u. a. 2005)), sind zugleich ER-Membranproteine (ABCD4, ABCD5) (Holzinger u. a. 1997), oder in den Fettstoffwechsel der Zelle eingebunden (ACSL5) (Gassler u. a. 2007) und könnten somit eine Verbindung mit der ORMDL-Funktion außerhalb ihrer Funktionen für das Peroxisom haben. Der Nutzen einer erfolgreichen Screening-Untersuchung für die PPI eines Proteins gegen eine peroxisomale Proteinbibliothek konnte durch unsere Arbeitsgruppe auch bereits zuvor für ABCD1 gezeigt werden (Hillebrand u. a. 2012). Insgesamt waren von den 231 Interaktionsexperimenten mit zufällig ausgewählten oder peroxisomalen Proteinen und ORMDL1, ORMDL2 oder ORMDL3 nur 24 positiv (dies entspricht 10,3 %).

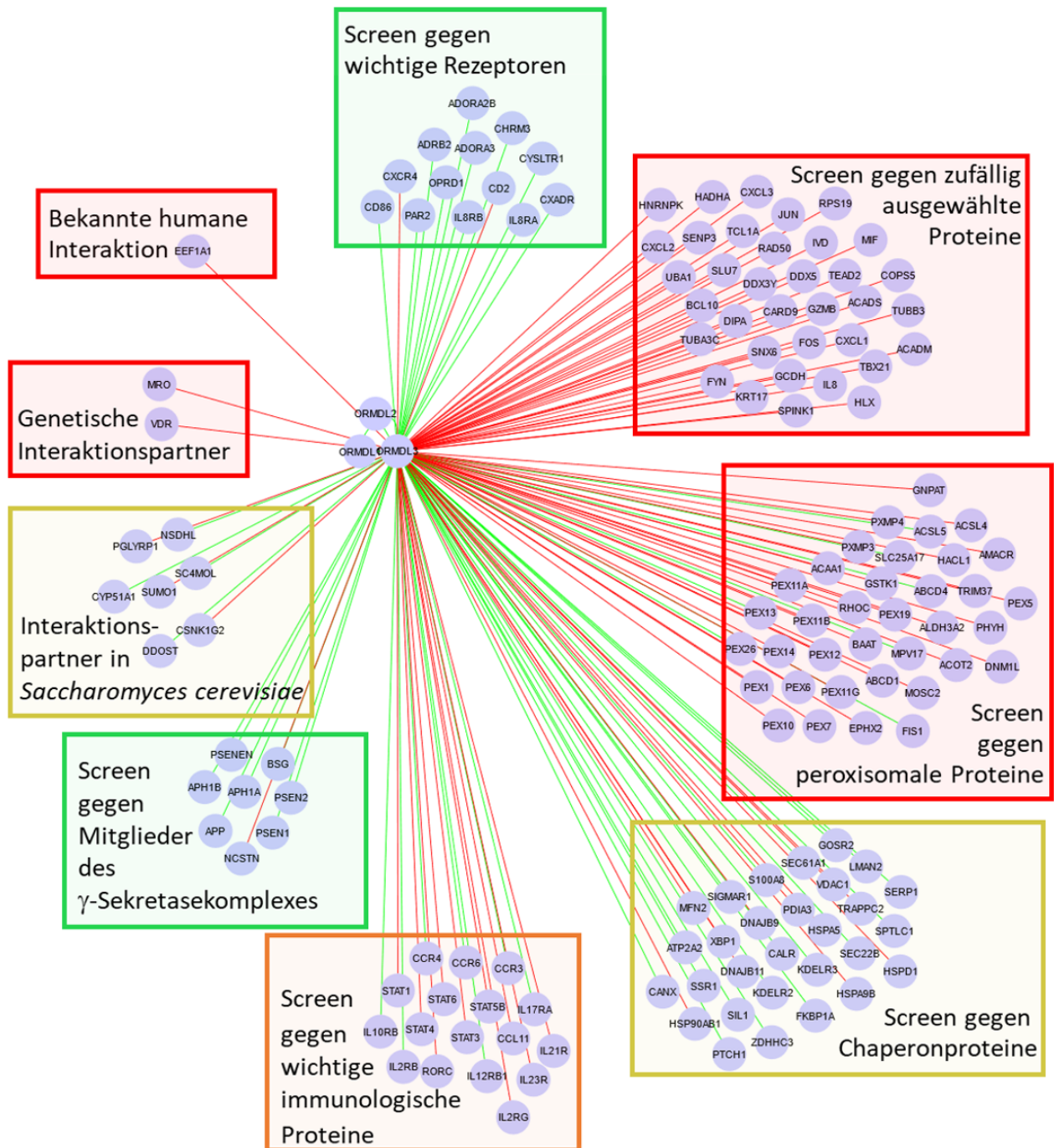
#### 4.2.7 Methodische Aspekte zum erweiterten ORMDL-Interaktom

Die Vorteile der BRET-Methode bei der Untersuchung von PPI sind bekannt, hier sind zum Beispiel die Expression der Proteine in ihrem subzellulären Kompartiment zu nennen oder auch die hohe Sensitivität und Spezifität der Methode verglichen mit den Standardmethoden wie Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen (Gersting u. a. 2012). Bei der Interpretation der gezeigten Ergebnisse sind jedoch mindestens zwei weitere Faktoren zu bedenken. Zum einen wurden die Versuche aufgrund der sehr hohen benötigten Zellzahl mit zugleich stabiler Expression der transfizierten DNA-Konstrukte in einer COS-7-Zelllinie durchgeführt. Es handelt sich um eine durch Virustransformation (mit SV40) immortalisierte Nierenzelle der äthiopischen Grünmeerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Die mittels unserer BRET-Methode nachgewiesenen PPI wurden mit humanen cDNA-Konstrukten durchgeführt (Gluzman 1981, Jensen u. a. 2008). Die Etablierung einer Untersuchung der hier gezeigten PPI in humanen bronchialen glatten Muskelzellen (Human Bronchial Smooth Muscle Cells (HBSMC)) wurde zwar im Rahmen dieser Dissertation versucht, ließ sich jedoch aufgrund der mangelnden Transfektionseffizienz mit verschiedenen Transfektionsmethoden wie Nukleofektion und Lipofektion nicht ver-

wirklichen. Zweitens handelt es sich bei der stabilen Expression der cDNA-Konstrukte um eine Überexpression verglichen mit dem physiologischen Expressionsniveau unter der Kontrolle des im pDEST51-Vektor enthaltenen humanen EF-1 $\alpha$ -Promotors. Hierbei handelt es sich jedoch um einen Nachteil, der mit allen etablierten Systemen zur Untersuchung von PPI verbunden ist (Jacobs u. a. 2003, C. Wu u. a. 2012). Dennoch muss dieser Aspekt bei der Wertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die parallel zu dieser Doktorarbeit erfolgte Etablierung des iBRET-Systems in der AG *Molekulare Pädiatrie* macht den Ansatz der Annäherung an die Funktion eines Proteins über die Untersuchung seines Interaktoms in der Zukunft noch deutlich praktikabler. Innerhalb von einer Woche ist nun die Untersuchung von 256 PPI möglich, bei größerer Genauigkeit durch die fast vollständige Automatisierung und mit höherer Sensitivität und Spezifität durch die Anpassung der Schwellenwerte. Hierzu trägt auch die Etablierung eines umfassenden cDNA-Repositoriums mit bereits im pEXP-BRET-Vektor vorliegenden Konstrukten bei. Ein solches wird in der AG *Molekulare Pädiatrie* Schritt für Schritt aufgebaut. Im Rahmen dieser Dissertation wurde dieses Repositorium um 53 cDNAs mit jeweils vier korrespondierenden Expressionsvektoren (mithin um 212 neue Vektoren) erweitert. Stand Dezember 2018 umfasst das cDNA-Repositorium der Arbeitsgruppe nun BRET-Expressionsvektoren für 658 verschiedene Proteine.

#### 4.2.8 Identifikation des *hub*-Proteins ORMDL

Die zahlreichen Interaktionen von ORMDL mit Proteinen ganz unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation und Funktion zeigen, dass die ORMDL-Proteine in eine Vielzahl zellulärer Prozesse eingebunden sind - über 160 neu nachgewiesene PPI von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 belegen dies. Die zahlreichen beschriebenen Funktionen von ORMDL (u.a. Araki u. a. 2007, Breslow u. a. 2010, Bugajev u. a. 2015, Cantero-Recasens u. a. 2009, Carreras-Sureda u. a. 2013, Ha u. a. 2013, S. Han u. a. 2010, Hjelmqvist u. a. 2002, Kallsen u. a. 2015, Miller u. a. 2012, Zhuang u. a. 2013) finden eine Entsprechung in der Anzahl der Interaktionspartner. Im Rahmen der *disease module hypothesis* (Barabási u. a. 2011) wird angenommen, dass nur eine geringe Anzahl von Erkrankungen durch Veränderungen innerhalb eines einzigen Gens verursacht werden. Die überwiegende Zahl aller Erkrankungen, so auch eine komplexe Erkrankung wie Asthma, für die eine multifaktorielle Pathogenese mit einem Einfluss von genetischen und Umwelt-Faktoren angenommen wird, entstehen innerhalb gestörter komplexer funktioneller intrazellulärer Netzwerke (Barabási u. a. 2011, Menche u. a. 2015). Das Ziel der Netzwerkmedizin ist es, die molekulare Komplexität von Erkrankungen zu verstehen, distinkte mit einer Erkrankung assoziierte Module und Signalwege innerhalb des Interaktoms zu identifizieren, die biologische Funktion von in GWAS und Genomsequenzierungen identifizierten krankheitsrelevanten Mutationen zu entschlüsseln und letztendlich gemeinsame Ursachen phänotypisch ähnlicher und unterschiedlicher Erkrankungen zu belegen (Barabási u. a. 2011, Menche u. a. 2015). Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, eine Reihe von Asthma-relevanten Signalwegen und Zellfunktionen innerhalb des ORMDL-



**Abbildung 4.1:** Darstellung der einzelnen Gruppen an PPI-Untersuchungen für ORMDL3 (Verbindungslien: grün = positive Interaktionen; rot = negativ getestete Interaktionspaare; Nodes: getestete Proteine).

Interaktoms zu verorten. Es ergibt sich jedoch die Frage, wie sich diese zahlreichen und komplexen Regulations- und Funktionsweisen der ORMDL-Proteine erklären lassen. PPI-Netzwerke zeigen die Topologie skalenfreier Netzwerke (Cumberworth u. a. 2013). Solche Netzwerke bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen, die nur eine geringe Zahl von Interaktionspartnern haben, und einer kleinen Zahl von Proteinen, die mit zahlreichen anderen Proteinen interagieren (Cumberworth u. a. 2013). Diese Proteine werden als *hubs* (Englisch, zu übersetzen als Knotenpunkt) bezeichnet. Ab welcher Anzahl von Proteininteraktionspartnern eines Proteins man von einem *hub* spricht ist nicht einheitlich festgelegt, in größeren Interaktomstudien wird jedoch bereits ab fünf nachgewiesenen Interaktionspartnern von einem *hub* gesprochen (Mirzazadee u. a. 2010). Skalenfreie Netzwerke sind relativ robust gegenüber dem Ausfall von Proteinfunktionen oder -interaktionen, es sei denn, es handelt sich bei den betroffenen Proteinen um wichtige *hubs* (Cumberworth u. a. 2013). Aufgrund der großen Anzahl der in dieser Dissertation gezeigten PPI lässt sich postulieren, dass es sich bei den ORMDL-Proteinen um *hubs* handelt. Man unterscheidet zwei verschiedene Kategorien von *hubs*: *party hubs* (auch als *multi-interface* oder *stable hubs* bezeichnet) und *date hubs* (auch als *singlish-interface* oder *transient hubs* bezeichnet). *Party hubs* interagieren mit mehreren anderen Proteinen zugleich, während *date hubs* ihre Interaktionspartner transient und zu verschiedenen Zeitpunkten binden (Andorf u. a. 2013, Cumberworth u. a. 2013, Mirzazadee u. a. 2010). Für *date hubs* ist bekannt, dass sie überproportional häufig und überproportional viele intrinsisch ungeordnete Regionen (*intrinsically disordered regions*, ID regions) enthalten (Ekman u. a. 2006, Cumberworth u. a. 2013, P. M. Kim u. a. 2008, Singh u. a. 2007). Diese Assoziation zwischen *date hubs* und ID-Regionen ist ein Hinweis auf die Bedeutung von intrinsisch ungeordneten Regionen für nicht-simultane PPI (Cumberworth u. a. 2013). PPI sind dadurch hochdynamisch, halten häufig nur sehr kurz an und können beispielsweise durch Phosphorylierungen modifiziert werden (Cumberworth u. a. 2013, P. M. Kim u. a. 2008, Keskin u. a. 2008).

Als intrinsisch ungeordnete Regionen bzw. Proteine werden solche Proteine beziehungsweise Proteinabschnitte bezeichnet, die keine feste dreidimensionale Struktur aufweisen (Dyson u. a. 2005, Oldfield u. a. 2014). Es wird unterschieden zwischen MoRF (*molecular recognition feature*), SLiM (*short linear motif*) und LCR (*low complexity region*) Anteilen innerhalb der ID-Regionen. MoRF-Regionen (normalerweise 10-70 Aminosäuren lang) durchlaufen eine tertiäre Konformationsänderung von einem ungeordneten in einen geordneten Zustand, wenn sie eine Bindung an ein anderes Protein eingehen und sind dadurch in der Lage, verschiedene andere Proteine stabil zu binden (Cumberworth u. a. 2013). SLiM sind kurze (normalerweise unter 10 Aminosäuren lang), evolutionär konservierte Sequenzen, die ebenfalls über eine Konformationsänderung von einem ungeordneten in einen geordneten Zustand übergehen und verschiedene andere Proteine spezifisch binden können. LCR hingegen sind längere Aminosäuresequenzen, die aus wenigen sich wiederholenden Aminosäuren bestehen und beispielsweise als Linkerketten eine hohe räumliche Flexibilität ermöglichen können (Cumberworth u. a. 2013). Die Vorhersage potenzieller intrinsisch unregulierter Regionen aus der Aminosäuresequenz ist mit circa 80 % Genauigkeit über verschiedene *disorder prediction* Algorithmen

möglich (Ferron u. a. 2006). Die Vorhersagen beruhen darauf, dass in intrinsisch unregulierten Regionen wenige große hydrophobe Aminosäuren und viele polare sowie geladene Aminosäuren zu finden sind (Ferron u. a. 2006). Es existieren zahlreiche Web-basierte Vorhersagealgorithmen (z. B. Dosztányi u. a. 2005, Ferron u. a. 2006, Yachdav u. a. 2014). Tatsächlich lässt sich über *IUPred* (abgerufen am 12.10.2015, Dosztányi u. a. 2005), die *Eukaryotic Linear Motif Resource for Functional Sites in Proteins* (ELM) (abgerufen am 12.10.2015, Dinkel u. a. 2014) oder *PredictProtein* (abgerufen am 12.10.2015, Yachdav u. a. 2014) in ORMDL3 eine N-terminal gelegene und circa acht bis zwölf Aminosäuren lange ID-Region identifizieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ORMDL3- $\delta$ 1-16 Proteine, denen diese 16 N-terminalen Aminosäuren fehlen, zwar exprimiert werden und im ER lokalisiert sind, jedoch in der Calciumhomöostase nicht funktional sind (Carreras-Sureda u. a. 2013).

*Date hubs* sind signifikant häufiger als andere Proteine am Prozess der Phosphorylierung beteiligt (Cumberworth u. a. 2013, Shimizu u. a. 2009) oder üben sogar selbst eine Kinase-Funktion aus (P. M. Kim u. a. 2008). Für die Hefehomologe der ORMDL-Proteine ORM1 und ORM2 konnte bereits gezeigt werden, dass multiple unterschiedlich stark phosphorylierte Unterformen existieren (Breslow u. a. 2010), die Phosphorylierung durch die YPK1-Kinase vermittelt wird (Roelants u. a. 2011), dass die Phosphorylierung der ORM-Proteine im Rahmen der homöostatischen Regulation nach einer Störung der Sphingolipidbiosynthese erfolgt (Breslow u. a. 2010) und dass die Entfernung der N-terminalen Phosphorylierungsstellen im ORM-Protein zu einer Aufhebung der negativ-regulatorischen Funktion von ORM in der Sphingolipidbiosynthese führt (Breslow u. a. 2010). Obwohl die veränderten ORM-Proteine in ähnlicher Menge exprimiert werden und weiterhin Homo- und Heterooligomere bilden können sowie mit LCB1 interagieren, verlieren sie die Fähigkeit den SPOTS-Komplex zu bilden und somit ihre regulatorische Funktion auszuüben (Breslow u. a. 2010). Dies ist interessant, denn es belegt zum einen, dass die potenziellen *date hub* Proteine der ORM-Familie einer Phosphorylierung unterliegen und zum anderen, dass es PPI gibt, wie die Homo- und Heterooligomerisierung, die davon unabhängig sind, aber auch PPI (etwa mit dem SPOTS-Komplex), die von der Phosphorylierung abhängig sind. Für die humanen ORMDL-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie zudem die Phosphorylierung anderer Proteine regulieren, beispielsweise über die MAP-Kinasen MAPK1 und MAPK3 (Ha u. a. 2013) oder die Serin-Threonin-Proteinkinase AKT (Bugajev u. a. 2015). Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass die Aminosäuresequenz der ORM-Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* am N-Terminus zwischen 20-60 Aminosäuren länger ist als die der humanen ORMDL-Proteine (Hjelmqvist u. a. 2002, Kiefer u. a. 2015) und dort auch eine entsprechend längere intrinsisch unregulierte Region tragen (ELM-Vorhersage, abgerufen am 14.10.2015, Dinkel u. a. 2014).

Es zeigt sich, dass intrinsisch unregulierte Regionen auch in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen eine Rolle spielen, da über eine veränderte Expression dieser Proteine unerwünschte und unkontrollierte Interaktionen mit anderen Proteinen (insbesondere solchen, die ebenfalls ID Regionen enthalten) zustande kommen (Cumberworth u. a. 2013). So konnte gezeigt werden, dass bei zunehmender Überexpression besonders die Protei-



ne, die intrinsisch unstrukturierte Regionen enthalten, die Zellfunktion in *Saccharomyces cerevisiae* einschränken (Vavouri u. a. 2009). Eine solche Abhängigkeit pathologischer PPI von der Menge an exprimierten Proteine (*mass-action-driven molecular interactions*) ist für humane Onkogene bekannt und einer der bekannten Pathomechanismen bei der Entstehung von verschiedenen Tumorerkrankungen (Vavouri u. a. 2009). Im Umkehrschluss dient die genaue Kontrolle der Expression solcher Proteine der Verhinderung von nicht-funktionalen PPI (Cumberworth u. a. 2013). Dies ist aus zwei Gründen bedeutsam für die ORMDL-Proteine: zum einen führen die bekannten Risikoallele für Asthma im Locus 17q21 wie in Kapitel 4.1 dargestellt primär zu einer veränderten Expression von ORMDL3, zum anderen bedeutet es für alle hier dargestellten Interaktionsexperimente, dass sie auch zahlreiche nicht-funktionale Interaktionen zeigen könnten aufgrund der Überexpression der Interaktionspartner, wie in Abschnitt 4.2.7 dargelegt.

Letztendlich bleibt festzuhalten, dass die ORMDL-Proteine eine hohe Promiskuität zeigen und wahrscheinlich eine Funktion als *date hub* ausüben. Die gezeigte Promiskuität kann auf der nachgewiesenen Homo- und Heterooligomerisierung beruhen, die die Bildung größerer und stabilerer Proteinkomplexe begünstigen (Ispolatov u. a. 2005), wie auch auf den prädiagnostizierten ID-Regionen. Es lässt sich feststellen, dass wir (1) für ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mehr als 150 bisher unbekannte PPI nachweisen konnten, (2) sich die Interaktome der einzelnen ORMDL-Varianten als Hinweis auf eine gemeinsame Funktion nur minimal voneinander unterscheiden, (3) sich in diesem Interaktom zahlreiche Interaktionspartner wiederfinden, die Funktionen innerhalb der mit den ORMDL-Proteinen assoziierten Prozesse der Sphingolipidbiosynthese, des Calciumhaushalts, des Immunsystems und der UPR haben und (4) die ORMDL-Proteine darüber hinaus mit zahlreichen Membranproteinen und wichtigen Rezeptoren der Asthmapathogenese und -therapie interagieren.

### 4.3 ORMDL und $\beta_2$ -AR

Der alleinige Nachweis einer PPI kann nicht die funktionelle Relevanz dieser Interaktion belegen, wohl aber als Ausgangspunkt für die weitere Untersuchung einer gemeinsamen Funktion von zwei Proteinen dienen. Wir konnten eine Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit dreizehn GPCR identifizieren (CCR3, CCR4, CCR6, ADORA3, ADORA2b,  $\beta_2$ -AR, CXCR1, CXCR2, CHRM3, CYSLTR1, F2RL1, OPRD1, SSR1), sodass es sich bei der Interaktion zwischen den ORMDL-Proteinen und GPCR um eine Klassen-spezifische Funktion der ORMDL-Proteine handeln könnte. Dies sind die ersten nachgewiesenen PPI zwischen GPCR und ORMDL. Modellhaft untersuchten wir die Interaktion von ORMDL und  $\beta_2$ -AR genauer. Die Interaktionen zwischen ORMDL-Varianten und  $\beta_2$ -AR erschienen uns bedeutsam, da es sich bei  $\beta_2$ -AR um das am besten untersuchte Protein in der Asthmapathogenese und -genetik handelt. Tatsächlich handelt es sich bei  $\beta_2$ -AR um eines der am besten untersuchten Proteine der gesamten Biowissenschaften, das auch als Modellsystem zum Verständnis von GPCR genutzt wird (J. K. L. Walker u. a. 2011). Als gesichert kann gelten, dass über den  $\beta_2$ -AR wich-

tige physiologische Reaktionen wie die Bronchodilatation gesteuert werden, dass über seine Aktivierung auch die Bronchokonstriktion auf unspezifische Reize (z. B. Hizawa 2009) oder Cholinergika (z. B. Rhoden u. a. 1988) vermindert, die mukoziliäre Clearance verstärkt (z. B. Davis u. a. 1980, Devalia u. a. 1992) und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Mastzellen unterdrückt (z. B. Butchers u. a. 1991) werden. Gegenstand zahlreicher Vorarbeiten (siehe auch Kapitel 1.3) sind die Wirkungen der unterschiedlichen, lang- und kurzwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika am  $\beta_2$ -AR (Asthmatherapie), die Auswirkungen der zahlreichen nachgewiesenen Allele des  $\beta_2$ -AR sowohl auf das Erkrankungsrisiko als auch den Erkrankungsverlauf (Asthmapathogenese) als auch die Wirksamkeit der  $\beta$ -Sympathomimetika in Abhängigkeit vom Allelstatus (Pharmakogenetik). Wir untersuchten die Bedeutung der Interaktion von ORMDL und  $\beta_2$ -AR wie folgt:

- (1) In einem ersten Schritt verifizierten wir die Interaktion von ORMDL mit  $\beta_2$ -AR in der Koimmunpräzipitation und charakterisierten mittels BRET die Interaktionskinetik von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR genauer.
- (2) Da aus der Literatur bekannt ist, dass  $\beta_2$ -AR Oligomere bilden und dass ihre Interaktionskinetik durch die Zugabe von  $\beta$ -Sympathomimetika moduliert werden kann, vollzogen wir diese Ergebnisse zunächst in unserem BRET-System nach, bevor wir (3) die Interaktion von ORMDL3 mit den unterschiedlichen Allelen des  $\beta_2$ -AR sowie (4) die Modulation dieser Interaktionen durch  $\beta$ -Sympathomimetika untersuchten.
- (5) Schließlich untersuchten wir aufgrund der ER-Lokalisation der ORMDL-Proteine, der nachgewiesenen Interaktionen mit einer Vielzahl GPCR und der nachgewiesenen Interaktion mit zahlreichen Chaperonen, ob die ORMDL-Proteine eine Funktion als akzessorische Proteine von  $\beta_2$ -AR ausüben, ob sie einen Einfluss haben auf die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR und ob dies vom  $\beta_2$ -AR-Allel abhängig ist.

### 4.3.1 Oligomerisierung von $\beta_2$ -AR und ORMDL

Die Interaktion zwischen  $\beta_2$ -AR und den drei Proteinen der ORMDL-Familie wurde in unseren Experimenten zum ORMDL-Interaktom in der Analyse möglicher Asthma-relevanter Proteine mittels BRET-Interaktionsexperimenten nachgewiesen. Der erste Schritt vor der genaueren Analyse dieser Interaktion war die Bestätigung der Interaktion mit einer alternativen Methode, die mittels Koimmunpräzipitation gelang. Wir konnten die Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR somit jeweils mit einer zuverlässigen biochemischen und einer zuverlässigen biophysikalischen Methode (Villaveces u. a. 2015) nachweisen. Es handelt sich um den ersten Nachweis einer Interaktion von ORMDL mit einem GPCR, um den ersten Nachweis einer Interaktion von ORMDL mit einem direkt in der Asthmapathogenese und -therapie involvierten Protein und zugleich um eine gemeinsame Eigenschaft aller drei ORMDL-Proteine.

Über BRET-Sättigungsexperimente ist eine genauere Charakterisierung der Kinetik von PPI möglich. In Sättigungsexperimenten konnten wir zeigen, dass ORMDL3 eine besonders hohe Affinität für die Bildung von Heterooligomeren mit  $\beta_2$ -AR hat verglichen

mit ORMDL1 oder ORMDL2. Die relative Bindungsaffinität war für die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR zwei- bis dreimal höher als für die anderen Kombinationen. Bei ORMDL3 handelt es sich auch um das am stärksten mit einem erhöhten Asthmarisiko assoziierte Proteine der ORMDL-Familie mit den zugleich höchsten Allelfrequenzen unter allen mit Asthma assoziierten Polymorphismen der ORMDL-Proteine (Toncheva u. a. 2015). Die durch uns in den Sättigungsexperimente ebenfalls nachgewiesene höhere BRETmax in der Oligomerisierung von ORMDL2 mit  $\beta_2$ -AR könnte zudem auf eine andere Quartärstruktur der Heterooligomere mit ORMDL2 hinweisen.

Relative Bindungsaffinitäten sind in der Konstitution multimerer Proteinkomplexe bedeutsam, da sie, in Abhängigkeit von weiteren Faktoren wie dem Expressionsniveau, Aktivierungszuständen mit Konformationsänderungen und der subzellulären Lokalisation, die genaue Zusammensetzung der Proteinkomplexe definieren (Perkins u. a. 2010). Letztendlich kann die Bindungsaffinität unter Berücksichtigung dieser anderen Faktoren dazu dienen, zu verstehen, wie fest das PPI-Netzwerk an einer Stelle verwoben ist. Zugleich können Mutationen in den Promotorregionen von Proteinen, die einen Einfluss auf das Expressionsniveau eines Proteins haben, über die Verschiebung der Oligomerzusammensetzungen ihren (patho-)physiologischen Einfluss ausüben (Kucukkal u. a. 2015, Lage 2014). Für das unter den drei ORMDL-Varianten am stärksten mit dem  $\beta_2$ -AR interagierende ORMDL3 konnte bereits gezeigt werden, dass sich die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko an kindlichem Asthma assoziierten Polymorphismen auf das Expressionsniveau auswirken (Moffatt u. a. 2007, Toncheva u. a. 2015).

Zusammenfassend konnte eine Interaktion von ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer gemeinsamen Funktion der ORMDL-Proteine in der Asthmapathogenese (Toncheva u. a. 2015), es fanden sich jedoch auch auf Proteinebene Hinweise darauf, dass die Assoziation für ORMDL3 besonderes stark ist. Vor einer weiteren Analyse der Interaktion von ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR erfolgte die genauere Charakterisierung der Oligomerisierung von  $\beta_2$ -AR im BRET-System.

#### 4.3.2 Homooligomerisierung von $\beta_2$ -AR

Wir untersuchten die  $\beta_2$ -AR-Homooligomerisierung mittels BRET, um zu testen, ob die aus der Literatur bekannten Eigenschaften in unserem BRET-System bestätigt werden können als Voraussetzung für die folgende Untersuchung der Interaktion von ORMDL mit  $\beta_2$ -AR unter dem Einfluss von  $\beta$ -Sympathomimetika und in Abhängigkeit vom  $\beta_2$ -AR-Allel. Für die Untersuchung von PPI im Zusammenhang mit Asthma ist der  $\beta_2$ -AR auch deshalb von besonderem Interesse, weil sich in den letzten Jahren die Erkenntnis durchsetzen konnte, dass  $\beta_2$ -AR als Dimere oder sogar höhergradige Oligomere ihre Funktionen an der Zelloberfläche ausüben und nicht wie zuvor vermutet als Monomere. So wurde durch BRET-Experimente gezeigt, dass  $\beta_2$ -AR Homodimere bilden, bereits im ER interagieren und in der Plasmamembran an der Zelloberfläche als Dimere existieren (Cao u. a. 2005, Hebert u. a. 1996, Lan u. a. 2011, Mercier 2002, Salahpour 2004).

Mutationen innerhalb des *ADRB2*-Gens, die zur Expression einer defekten Dimerisierungsdomäne führen, reduzieren die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR um mindestens 50 % trotz erhaltener Rezeptorkonformation und -funktion (Salahpour 2004) und Mutationen innerhalb der ER-Retentions-Regionen üben sogar einen dominant-negativen Effekt auf das *trafficking* von unveränderten  $\beta_2$ -AR zur Zelloberfläche aus (Salahpour 2004). Dies ist eine wichtige Erkenntnis, denn so könnten Polymorphismen in einem Allel einen dominanten Effekt auf beispielsweise das Wildtyp-Allel ausüben. In künstlichen Plasmamembranen konnte bis auf die Ebene einzelner Rezeptoren gezeigt werden, dass  $\beta_2$ -AR frei in der Plasmamembran diffundieren und in Abhängigkeit von ihrer Konzentration auch bereits bei fast physiologischen Konzentrationen an der Zelloberfläche als Monomere, Dimere, Trimere und Tetramere vorliegen (Calebiro u. a. 2013). Für die Internalisierung von der Zelloberfläche hingegen, die durch  $\beta$ -Sympathomimetika ausgelöst wird, ist eine Dimerisierung nicht notwendig, denn auch die Bindung eines  $\beta$ -Sympathomimetikums an Monomere oder einen der beiden  $\beta_2$ -AR eines Dimers reicht aus, um die Internalisierung auszulösen (Sartania u. a. 2007).

Die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR konnte in dieser Arbeit mittels BRET-Sättigungsexperimenten bestätigt werden. Es war bereits bekannt, dass diese Homooligomerisierung durch  $\beta$ -Sympathomimetika beeinflusst werden kann: Isoproterenol erhöht die Bildung von  $\beta_2$ -AR-Homodimeren (Hebert u. a. 1996) und stabilisiert diese, während Timolol als inverser Agonist den monomeren Zustand stabilisiert (Hebert u. a. 1996). Auch der Einfluss von Isoproterenol auf die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 ließ sich in BRET-Sättigungsexperimenten in dieser Arbeit bestätigen, da die Zugabe von Isoproterenol in unseren BRET-Experimenten die Affinität von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27, Homooligomere zu bilden, signifikant erhöhte. Es handelt sich bei unserem BRET-System also um einen geeigneten Versuchsaufbau, um die PPI von  $\beta_2$ -AR weiter zu charakterisieren. Die Stabilisierung der Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 konnten wir auch unter Zugabe der anderen kurzwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika Salbutamol und Clenbuterol beobachten, nicht jedoch für Salmeterol. Da Salmeterol im Vergleich zu den anderen  $\beta$ -Sympathomimetika jedoch nur an einen geringen Anteil (bei physiologischer Rezeptorkonzentration bereits nur circa 4 % (Johnson 2006)) aller  $\beta_2$ -AR bindet, ist ein fehlender Einfluss auf die Oligomerisierung plausibel. Es ließ sich also sowohl die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR (bzw. des häufigsten Allels  $\beta_2$ -AR-G16/Q27) als auch der bekannte, stabilisierende Einfluss von Isoproterenol auf diese Interaktion in unserem BRET-System nachvollziehen. Kurzwirksame  $\beta$ -Sympathomimetika können somit die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR stabilisieren, was entsprechend der Ergebnisse von Salahpour und Kollegen zu einer erhöhten Expression an der Zelloberfläche beitragen (Salahpour 2004) und somit einer Tachyphylaxie wie auch der Trennung der Dimere aufgrund der Agonisten-induzierten Internalisierung entgegenwirken könnte (Lan u. a. 2011).

### Hetero- und Homooligomerisierung der $\beta_2$ -AR-Allele

Wir untersuchten weiterhin den Einfluss der beiden wichtigsten Polymorphismen im *ADRB2*-Gen auf die Rezeptoroligomerisierung. Diese beiden für Aminosäureänderungen codierenden Polymorphismen des *ADRB2*-Gens liegen an Position 46 (mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz an Position 16 von Arginin (R) zu Glycin (G)) sowie an Position 79 der Nukleinsäuresequenz (mit einer Aminosäureänderung an Position 27 von Glutamat (E) zu Glutamin (Q)). Die Häufigkeit des R16-Allels liegt bei 0.39 in Kaukasiern, 0.50 in Afroamerikanern und 0.40 in Asiaten, während das Q27-Allel eine Verteilung von 0.57, 0.73 beziehungsweise 0.80 hat (Chung u. a. 2011). Diese Einzelnukleotid-Polymorphismen sind in einem starken Linkage-Disequilibrium: während R16/E27 sehr selten ist, finden sich die Kombinationen G16/Q27, G16/E27 und R16/Q27 häufig (Hawkins u. a. 2008).  $\beta_2$ -AR mit diesen drei häufigen Polymorphismen-Kombinationen wurden in den Interaktionsexperimenten verwendet. Drysdale und Kollegen beschreiben insgesamt sogar dreizehn Polymorphismen innerhalb des *ADRB2*-Gens, die sich in zwölf häufige Allele aufgliedern (Drysdale u. a. 2000, Hawkins u. a. 2008). Einen Einfluss weiterer Polymorphismen auf unsere Ergebnisse können wir hier nicht ausschließen, da sich innerhalb der 5'-UTR und der 3'-UTR weitere 49 Polymorphismen befinden (Chung u. a. 2011). Wir konnten hier jedoch erstmals zeigen, dass sich die drei häufigsten Allele der beiden im Zusammenhang mit der Pathogenese sowie Pharmakogenetik von Asthma am besten untersuchten Polymorphismen in ihren Eigenschaften zur Bildung von Homo- und Heterooligomeren nicht unterscheiden. Im Vergleich mit  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 zeigen  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 gleiche Affinitäten entsprechend ihrer BRET<sub>50</sub> für die Bildung von Homo- bzw. Heterooligomeren. Dieses Ergebnis ist gut damit vereinbar, dass sich diese Polymorphismen außerhalb der bekannten Bindungsdomänen (Gly84, Gly276, Gly280, Leu284 (Hebert u. a. 1996, Salahpour 2004)) befinden und ermöglicht es, die im Folgenden gezeigten Unterschiede in der Oligomerisierung von ORMDL3 mit den  $\beta_2$ -AR-Varianten als unabhängig von einer theoretisch möglichen Veränderung der Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR zu deuten.

### Pharmakogenetik von $\beta_2$ -AR

Neben den Untersuchungen zur Assoziation von Polymorphismen des  $\beta_2$ -AR mit Asthma bronchiale gibt es zahlreiche experimentelle und klinische Studien zur Wirksamkeit der  $\beta$ -Sympathomimetika in Abhängigkeit von Polymorphismen des Rezeptors. Der  $\beta_2$ -AR oszilliert zwischen aktiven und inaktiven Zuständen, wobei in Ruhe der inaktive Zustand dominiert. Die Agonisten und Antagonisten entfalten ihre Wirkung am ehesten durch die Stabilisierung von aktivem bzw. inaktivem Zustand. Komplette Agonisten stabilisieren alle Rezeptoren im aktiven Zustand, partielle nur einen Teil, während inverse Agonisten den inaktiven Zustand stabilisieren, ebenso wie Antagonisten (Johnson 2006). Es wird davon ausgegangen, dass über 70 % der Heterogenität der  $\beta$ -Sympathomimetika-Wirkung genetisch determiniert ist (Drazen u. a. 2000, Evans u. a. 2003, Hizawa 2011, Weiss u. a. 2006), aber es ist noch unklar, in wieweit Polymorphis-

men des  $\beta_2$ -AR selbst für die Medikamentenwirkung entscheidend sind. Es gibt jedoch deutliche Hinweise darauf, dass bestimmte Polymorphismen einen ungünstigen Einfluss auf den Effekt einer Dauertherapie mit lang-wirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika auf Asthma bronchiale haben (Hizawa 2011). In einer großen Placebo-kontrollierten Studie führte die Dauertherapie mit Salmeterol über 28 Wochen zu einer Zunahme von Todesfällen in der Therapiegruppe (13 vs. 3 Todesfälle bei ca. 13.000 Patienten in beiden Therapiearmen) (Nelson u. a. 2006). Auch die Menge an regelmäßig eingenommenen kurzwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika ist positiv korreliert mit einer steigenden Mortalität, und zwar insbesondere für Afro-Amerikaner (Spitzer u. a. 1992, Suissa u. a. 1994). Dies führte dazu, dass Isoproterenol vom Markt genommen wurde (J. K. L. Walker u. a. 2011). Eine Metaanalyse zum Effekt der langwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika mit über 33.000 Patienten kam sogar zu dem Schluss, dass diese insgesamt das Auftreten von schweren und lebensbedrohlichen Asthmaexazerbationen und damit auch die Anzahl der Asthma-assoziierten Todesfälle erhöhen (Salpeter u. a. 2006), was schließlich zu einer Sicherheitswarnung durch die *Federal Drug Administration* für die Dauertherapie mit Salmeterol führte (Ortega u. a. 2010). Der genaue Einfluss der Polymorphismen ist jedoch noch unzureichend verstanden, in einer aktuellen Studie von Wechsler und Kollegen konnte unabhängig von Polymorphismen an Position 16 oder 27 des  $\beta_2$ -AR kein Vorteil einer Dauertherapie mit LABA in Afro-Amerikanern gezeigt werden (Wechsler u. a. 2015). Ganz grundsätzlich zeigen die Adrenorezeptoren in humanen glatten Muskelzellen der Bronchien auch unabhängig von Polymorphismen an Position 16 und 27 eine normale Bindung der Agonisten und eine Aktivierung (gemessen als Adenylcyclaseaktivität) als Hinweis auf eine grundsätzliche Funktionsfähigkeit (Green u. a. 1994, Green u. a. 1995). Dennoch ist für  $\beta_2$ -AR-G16 in einigen Studien eine geringere Wirksamkeit von kurzwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika beschrieben worden (Asano u. a. 2010, Choudhry u. a. 2005, Lipworth 1999, Martinez u. a. 1997, S. Tan u. a. 1997). Andere Studien hingegen fanden keinen Zusammenhang (Hawkins u. a. 2006, Taylor 2007), was sich möglicherweise wiederum durch die fehlende Beachtung weiterer Polymorphismen erklären lässt (Drysdale u. a. 2000). Für  $\beta_2$ -AR-R16 ist gezeigt worden, dass es zu einem schlechteren Verlauf mit höherer bronchialer Hyperreagibilität und schweren Exazerbationen unter einer Dauertherapie mit Sympathomimetika kommen kann (Basu u. a. 2009, Blake u. a. 2015, Hizawa 2011, Israel u. a. 2001, Israel u. a. 2004, Taylor u. a. 2000, S. Turner u. a. 2016, Wechsler u. a. 2009, Zuurhout u. a. 2013) wie auch zu einem schlechteren Ansprechen auf  $\beta$ -Sympathomimetika mit längerer Aufenthaltsdauer auf Intensivstationen, wenn eine Exazerbation auftritt (Carroll u. a. 2009). Auch hier gibt es jedoch Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dem Allelstatus und der Wirkung von  $\beta$ -Sympathomimetika gefunden haben (Bleecker u. a. 2007, Bleecker u. a. 2010, Meyers u. a. 2014) und weiterhin ist ein besseres Ansprechen auf kurzwirksame  $\beta$ -Sympathomimetika für  $\beta_2$ -AR-R16 homo- oder heterozygote Patienten (und Probanden) bei einmaliger Anwendung beschrieben worden (Martinez u. a. 1997, Lima u. a. 1999).

Unklar sind auch die Auswirkungen der  $\beta_2$ -AR-Allele auf die Oberflächenexpression. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Vorarbeiten noch eindeutig zu interpretieren

(Litonjua 2004), seit der Publikation von Panebra und Kollegen treffen die beiden wichtigsten Arbeiten hinsichtlich der Oberflächenexpression und ihrer Regulierung durch  $\beta$ -Sympathomimetika jedoch gegenteilige Aussagen, was eine funktionelle Bewertung der Ergebnisse zum jetzigen Zeitpunkt schwierig macht (Green u. a. 1993, Panebra u. a. 2010). In der Arbeit von Green und Kollegen aus dem Jahr 1993 berichteten diese, dass  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 mit  $26 \pm 3$  % eine geringere Herabregulierung der Oberflächenexpression in Folge von  $\beta$ -Sympathomimetika-Stimulation zeigt als  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 ( $41 \pm 3$  %) oder  $\beta_2$ -AR-G16/E27 ( $39 \pm 4$  %) (Green u. a. 1993). In der Arbeit von Panebra und Kollegen aus dem Jahr 2010 wurde hingegen gezeigt, dass  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 entweder eine erhöhte oder eine normale Herabregulation zeigt abhängig von weiteren Polymorphismen innerhalb der 5'-UTR- und der 3'-UTR-Region von *ADRB2*, während  $\beta_2$ -AR-G16/E27 und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 eine normale Herabregulierung haben (Panebra u. a. 2010). Für die Oberflächenexpression fanden Green und Kollegen eine Verminderung bei  $\beta_2$ -AR-G16/E27, während Panebra und Kollegen eine Erhöhung fanden (Green u. a. 1994, Panebra u. a. 2010). Außerdem war bei Panebra und Kollegen die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 entweder erhöht oder regulär, während  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 eine normale Expression zeigte (Panebra u. a. 2010). Hier zeigt sich die Wichtigkeit der Einbeziehung mehrerer Kombinationen an Polymorphismen sowie die Beachtung möglicher Linkage-Disequilibrien, denn diese Unterschiede resultieren wahrscheinlich aus der Missachtung weiterer konfundierender Polymorphismen, die, wenn sie sich in einem starken Linkage-Disequilibrium mit den untersuchten Polymorphismen befinden, einen besonders starken Einfluss haben.

Eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf eine individualisierte Pharmakotherapie ist aufgrund der uneindeutigen Studienlage bisher noch nicht möglich gewesen, und die bisher untersuchten *ADRB2*-Polymorphismen erklären möglicherweise nur einen kleinen Teil der Heterogenität (Hizawa 2011, J. K. L. Walker u. a. 2011). Dem negativen Einfluss der langwirksamen  $\beta$ -Sympathomimetika zugrunde liegen könnten unabhängig von genetischen Einflüssen beispielsweise das spätere Erkennen einer Krankheitsprogression mit Übertünchen der zugrundeliegenden fortschreitenden Inflammation oder die zunehmende Desensitivierung der  $\beta_2$ -AR mit konsekutiver Herabregulation (Hizawa 2011). Zur Vorhersage der Wirksamkeit der  $\beta$ -Sympathomimetika in Abhängigkeit vom Allelstatus werden in Zukunft größere, prospektive Studien beitragen (Hizawa 2011, Miller u. a. 2012, Ortega u. a. 2014), die zum Teil auch schon Patienten rekrutieren (Vijverberg u. a. 2017). Die Frage, ob über eine pharmakogenetische Stratifizierung eine Minimierung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen erreicht werden kann, bleibt relevant. Wir konnten nun zeigen, dass für die Homooligomerisierung von  $\beta_2$ -AR-G16/E27 oder  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 im Gegensatz zu  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 kein stabilisierender Einfluss durch Isoproterenol oder ein anderes  $\beta$ -Sympathomimetikum nachweisbar ist. Die Veränderungen von Bindungsaffinitäten unter einer Stimulation mit Rezeptoragonisten wurden bisher noch nicht in Abhängigkeit von Allelstatus untersucht, sodass es sich hier um den ersten Nachweis einer Abhängigkeit der Bindungsaffinitäten der  $\beta_2$ -AR-Allele von der Medikamentenzugabe handelt.

### 4.3.3 Oligomerisierung von ORMDL3 mit $\beta_2$ -AR wird durch $\beta_2$ -AR-Allele und $\beta$ -Sympathomimetika beeinflusst

Nachdem wir zeigen konnten, dass sich im BRET-System die Homooligomerisierung der  $\beta_2$ -AR-Varianten und der Einfluss von Isoproterenol nachvollziehen lassen, nutzen wir das System nun zur weiteren Charakterisierung der Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR. Bezüglich eines Einflusses von *ADRB2*-Polymorphismen auf die Entstehung von Asthma bronchiale sind die Forschungsergebnisse mittlerweile eindeutig. Es gibt keine einzelnen Polymorphismen im *ADRB2*-Gen, die reproduzierbar mit einem erhöhten Risiko an Asthma zu erkranken, assoziiert sind. Dies wurde für eine britische Geburtskohorte mit über 8.000 Probanden durch Hall und Kollegen gezeigt (I. P. Hall u. a. 2006). Auch große Metaanalysen konnten keinen Zusammenhang finden zwischen dem Risiko, an Asthma zu erkranken, und Polymorphismen des *ADRB2*-Gens (Liang u. a. 2014, Migita u. a. 2004). Entsprechend konnten Polymorphismen im *ADRB2*-Gen in den genomweiten Assoziationsstudien zu Asthma bronchiale auch nicht identifiziert werden (Ferreira u. a. 2014, Moffatt u. a. 2007, Myers u. a. 2014, Portelli u. a. 2015, Wjst u. a. 2013, Yatagai u. a. 2014). Mit dem Nachweis einer direkten Interaktion des mit Asthma-assoziierten Proteins ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR ist jedoch auch ein über die PPI mit ORMDL3 vermittelter indirekter Einfluss der  $\beta_2$ -AR-Polymorphismen auf das Asthmarisiko oder das Ansprechen auf  $\beta$ -Sympathomimetika in Abhängigkeit von Polymorphismen der *ORDML*-Gene möglich. Tatsächlich waren wir in der Lage zu zeigen, dass sich der  $\beta_2$ -AR-Allelstatus auf die Interaktion mit ORMDL3 auf Proteinebene auswirkt. Zunächst konnten wir auch für  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 eine Interaktion mit ORMDL3 nachweisen. Während sich die BRET<sub>max</sub> nicht signifikant für die einzelnen  $\beta_2$ -AR-Varianten unterschied als Hinweis auf eine ähnliche Konformation der Proteinkomplexe, war die relative Bindungsaffinität signifikant geringer für die Interaktion von ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 (BRET<sub>50</sub> 0,59) verglichen mit  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 (0,33) oder  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 (0,28). Abhängig von der ORMDL3-Funktion kann der Allelstatus hier einen Einfluss auf die Interaktion von  $\beta_2$ -AR und ORMDL3 haben und somit die Wirkung von ORMDL3 auf  $\beta_2$ -AR beeinflussen, wobei es möglich ist, dass sich der Polymorphismus an Position 27 im  $\beta_2$ -AR auf die Bindungsaffinität zu ORMDL3 auswirkt. Nachdem der Nachweis einer unterschiedlichen Bindungsaffinität von ORMDL3 zu den verschiedenen  $\beta_2$ -AR-Allelen geführt werden konnte, untersuchten wir auch den Effekt verschiedener  $\beta$ -Sympathomimetika auf die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR. Wir konnten zeigen, dass die  $\beta$ -Sympathomimetika Salmeterol, Clenbuterol und Isoproterenol auf die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR-R16/Q27,  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 oder  $\beta_2$ -AR-G16/E27 unterschiedliche Auswirkungen haben. Während die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR-G16/E27 nicht durch  $\beta$ -Sympathomimetika beeinflusst wird, führt Clenbuterol zu einer geringeren Bindungsaffinität zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 und Salmeterol wie auch Isoproterenol zu einer geringeren Affinität zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-R16/Q27. Die Mechanismen der einzelnen Ligandenbindungen unterscheiden sich zwischen und innerhalb von lang- und kurzwirksamen Sympathomimetika (Johnson 2006). Kurz-wirksame hydrophile Sympathomimetika wie Salbutamol wirken



direkt von extrazellulär auf den Rezeptor. Salmeterol hingegen als lang-wirksames Sympathomimetika ist circa 10.000 mal lipophiler als Isoproterenol und diffundiert daher innerhalb einer Minute in die Membran, bildet dort ein Depot, diffundiert dann jedoch in einem langsamen Prozess in das aktive Zentrum des  $\beta_2$ -AR, sodass eine Wirkung erst nach mehr als 30 Minuten eintritt. Die Wirkung der Agonisten hängt nicht nur von der Affinität, sondern auch von der Effektivität ab. Vollständige Agonisten sind Isoproterenol, Fenoterol und Formoterol, teilweise Agonisten sind Salbutamol und Terbutalin, während Salmeterol die niedrigste Effektivität hat (Johnson 2006). Die unterschiedliche Reaktion der  $\beta_2$ -AR-Allele auf lang- und kurz-wirksame  $\beta$ -Sympathomimetika sowie ihre unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften wollten wir uns in unseren Experimenten zur Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR unter dem Einfluss verschiedener Sympathomimetika zunutze machen. Aufgrund der Lokalisation von ORMDL3 im ER vermuteten wir, dass, falls sich überhaupt eine Wirkung der  $\beta$ -Sympathomimetika auf die Interaktion zwischen  $\beta_2$ -AR und ORMDL3 finden lassen würde, nur lipophile  $\beta$ -Sympathomimetika einen Einfluss haben sollten. So zeigte sich wie erwartet auch kein Effekt durch Zugabe von Salbutamol. Vereinbar mit dieser Theorie war auch der Einfluss von Clenbuterol auf die Interaktion zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR, der interessanterweise nur für  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 nachweisbar war, sodass sich nicht nur erstmals ein direkter Einfluss eines Sympathomimetikums auf die Interaktion von ORMDL mit  $\beta_2$ -AR zeigen lässt, sondern zusätzlich eine Abhängigkeit der Auswirkung von Clenbuterol vom Allelstatus. Die Zugabe von Clenbuterol führte dabei zu einer signifikant geringeren Affinität der Bindung zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-G16/Q27. Für die  $\beta$ -Sympathomimetika Salmeterol und Isoproterenol wiederum ließ sich eine Abnahme der Affinität zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR nur mit dem Allel R16/Q27 nachweisen. Dass das nur an der Zelloberfläche wirksame hydrophile  $\beta$ -Sympathomimetikum Isoproterenol einen Effekt auf die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 hatte, war unerwartet. Und auch die Wirkung des nur an eine geringe Anzahl von  $\beta_2$ -AR-bindenden Salmeterols auf die Affinität der Bindung zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 war nicht erwartet worden. Insgesamt lässt sich erstmals ein Einfluss von  $\beta$ -Sympathomimetika auch auf die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR nachweisen, zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht funktionell deuten. Alle gezeigten Wirkungen von  $\beta$ -Sympathomimetika auf die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR führen jedoch zu einer Abnahme der Bindungsaffinität. In Zusammenschau mit dem im Folgenden gezeigten Einfluss von ORMDL3 auf die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR würde dies zu einem dauerhaft geringeren Einfluss von ORMDL3 auf  $\beta_2$ -AR-G16/E27 und zu einem unter der Gabe von  $\beta$ -Sympathomimetika geringeren Einfluss auf  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 führen. Patienten mit einer konstitutiv hohen Expression von ORMDL3 könnten besonders sensibel für solche Effekte sein, die für  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 einen neuen Mechanismus der Tachyphylaxie unter  $\beta$ -Sympathomimetika-Therapie darstellen könnten.

#### 4.3.4 ORMDL3 als akzessorisches Protein für die Oberflächenexpression von $\beta_2$ -AR

Wir haben eine Interaktion von ORMDL mit drei  $\beta_2$ -AR-Allelen, Interaktionen mit zahlreichen weiteren GPCR und wichtigen Chaperonen des ER, die Homo- und Heterodimerisierung der drei ORMDL-Proteine und eine mögliche Funktion als *date hub* nachweisen können. Bekannt war zudem eine Lokalisation von ORMDL im ER (Hjelmqvist u. a. 2002). Aufgrund dieser Indizien vermuteten wir eine Funktion der ORMDL3-Proteine in der Proteinfaltung und Proteinqualitätskontrolle im ER und untersuchten daher den Einfluss einer ORMDL3-Überexpression auf die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR (und der Allele). Tatsächlich konnten wir mittels In-Cell/On-Cell-ELISA nachweisen, dass  $\beta_2$ -AR in Zellen mit einer ORMDL3-Überexpression verstärkt an der Zelloberfläche exprimiert wird. Über die Funktion als akzessorisches Protein mit der Kontrolle der Oberflächenexpression könnte ORMDL3 einen wichtigen Einfluss auf die Funktion von Membranrezeptoren wie  $\beta_2$ -AR ausüben ähnlich wie sie bereits für andere akzessorische Proteine nachgewiesen wurde. Solche akzessorischen Proteine, die insbesondere am *trafficking* von  $\beta_2$ -AR beteiligt sind, wurden bisher fast vollständig von einer Arbeitsgruppe um Dong und Kollegen (2008, 2010) beschrieben: ARF aus der Superfamilie der *Ras-related small GTPases* beispielsweise fungieren als Regulatoren des Vesikel-*traffickings*. Defektes ARF1 oder die Inaktivierung mit Brefeldin A führen zu einer Verminderung der Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR um 60-80 % (Dong u. a. 2010). Auch die Signaltransduktion über  $\beta_2$ -AR, gemessen als Aktivierung der ERK1/2-Kaskade nach Agonistengabe, wird inhibiert, wahrscheinlich bedingt durch die geringere Oberflächenexpression und  $\beta_2$ -AR sammelte sich in den defekten Zellen im ER (Dong u. a. 2010). Auch die Inhibition von Rab1, Rab8 oder SAR1 führt zur perinukleären Konzentration und verminderten Expression von  $\beta_2$ -AR (Dong u. a. 2008, Filipeanu u. a. 2006, G. Wu 2003), während eine Überexpression von Rab1 oder Rab8 keinen Einfluss hat (Filipeanu u. a. 2006). Mit dem Nachweis einer höheren Expression an der Zelloberfläche durch die Überexpression von ORMDL3 lässt sich ORMDL in die Reihe dieser akzessorischen Proteine aufnehmen, auch wenn der gegenteilige Nachweis einer verminderten Oberflächenexpression noch aussteht, da es im Rahmen dieser Dissertation nicht gelang, alle ORMDL-Proteine über die Gabe von siRNA zuverlässig auszuschalten. Weiterhin muss angemerkt werden, dass eine Reihe weiterer potenziell aufschlussreicher Experimente zur Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR nicht erfolgreich waren. Zunächst gelang es aufgrund einer zu geringen Transfektionseffizienz mit verschiedenen Methoden wie Lipofektion (u.a. DreamFect™) oder Nukleofektion (AMAXA®) nicht, die Experimente in der HBSMC-Zelllinie durchzuführen. Für diese Zelllinie ist eine höhere Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR bekannt. Weiterhin gelang es nicht, die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR auf COS7-Zellen oder HEK293-Zellen mittels Western-Blot nach Zellfraktionierung, Radioligandenassay oder Durchflusszytometrie zu quantifizieren. Auch Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der ORMDL3-Überexpression und der  $\beta_2$ -AR-Oberflächenexpression unter Verwendung eines cAMP-Assays und von Zellstressexperimenten waren aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht erfolgreich. Der erfolgte Nachweis im In-Cell/On-Cell-

ELISA konnte somit noch nicht durch eine zweite Methode bestätigt werden.

Hinsichtlich der Asthmapathogenese ist die erhöhte Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR unter der Überexpression von ORMDL3 unerwartet, denn eine verminderte Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR unter dem Einfluss einer ORMDL3-Überexpression wäre mit einer in der Folge verminderten Fähigkeit zur Bronchodilatation direkt mit einem höheren Risiko von Bronchospasmus und bronchialer Hyperreagibilität vereinbar gewesen. Die Regulation der Wirkung von  $\beta$ -Sympathomimetika ist jedoch deutlich komplexer als dieses simple Modell. Die dauerhafte oder verstärkte Stimulation von  $\beta_2$ -AR kann über eine antithetische Regulierung des  $\beta_2$ -AR (McGraw u. a. 2006, J. K. L. Walker u. a. 2011) zu unerwünschten Wirkungen führen. So gibt es durchaus Belege dafür, dass eine dauerhaft erhöhte Expression von  $\beta_2$ -AR in den glatten Muskelzellen der Bronchien zu einer bronchialen Hyperreagibilität führt. In transgenen Mäusen mit einer solchen Überexpression konnte eine erhöhte bronchiale Reagibilität nachgewiesen werden, die auf der dauerhaften Induktion einer höheren Expression von Phospholipase C und, über Phosphoinositide vermittelt, einer höheren Calcium-Ausschüttung mit stärkerer Muskelkontraktion beruht (McGraw u. a. 2003). Auch in Zellkulturen von HBSMC erhöhte eine dauerhaft verstärkte  $\beta_2$ -AR-Aktivierung die Histamin-assoziierte Ausschüttung von Phosphoinositid (Sayers u. a. 2006) oder auch die Aktivierung von STAT6 (Knight u. a. 2015). Der gleiche Mechanismus einer Hochregulierung von Phospholipase C lässt sich auch in Allergen-assoziierten Mausmodellen für Asthma bronchiale nachweisen, sodass die chronische Gabe von  $\beta$ -Blockern die Hyperreagibilität *in vitro* (Luo u. a. 2017) wie auch in verschiedenen Mausmodellen vermindern konnte (Callaerts-Vegh u. a. 2004, Lin u. a. 2008, Nguyen u. a. 2008). Vermindert wurde auch die Mucin-Produktion der Mausatemwege entweder durch die chronische Gabe von  $\beta$ -Blockern (Nguyen u. a. 2008) oder aber durch den Knockout des *ADRB2*-Gens (Nguyen u. a. 2009). In einem weiteren transgenen Asthma-Mausmodell konnte sogar gezeigt werden, dass Mäuse, die den  $\beta_2$ -AR-Agonisten Epinephrin nicht produzieren können, keinen Asthma-Phänotyp ausbilden können (Thanawala u. a. 2013), dass also eine Aktivierung über den  $\beta_2$ -AR für die Pathogenese von Asthma mitentscheidend ist. Eine weiterer möglicher Mechanismus unerwünschter Wirkungen einer dauerhaften Therapie mit  $\beta$ -Sympathomimetika wurde durch Loza und Kollegen aufgedeckt:  $\beta$ -Sympathomimetika führen in physiologischen und klinisch relevanten Konzentrationen über Antigen-unabhängige Mechanismen und Zytokin-abhängige Stimulation zu einer Anreicherung von Typ2 T-Helferzellen (Loza u. a. 2007, Loza u. a. 2008). Zusätzlich wird die Expression von *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) durch kurz- und langwirksame Sympathomimetika gefördert (Futamura u. a. 2010), was wiederum eine T2-Helferzell-assoziierte Metaplasie der Becherzellen, eine Entzündung der Atemwege und bronchiale Hyperreagibilität auslöst (Zhou u. a. 2005). Über  $\beta_2$ -AR kann also auch eine Regulation der T-Zellentwicklung und Zytokinexpression und damit der Asthmapathogenese und Therapiewirksamkeit erfolgen (J. K. L. Walker u. a. 2011). Daraus lässt sich ableiten, dass eine durch ORMDL3-Überexpression bedingte dauerhafte Überexpression von  $\beta_2$ -AR tatsächlich zu einer bronchialen Hyperreagibilität führen kann. Die unerwünschten Folgen wie beispielsweise erhöhter oxidativer Stress einer dauerhaften Aktivierung durch sympathische Hyperaktivität sind für

das kardiovaskuläre System gut belegt und Grundlage der Therapie mit  $\beta$ -Blockern (Davel u. a. 2014). Mittlerweile gibt es eine lebhafte Diskussion darüber, ob die chronische Anwendung von  $\beta$ -Blockern nicht auch in der Therapie von Asthma bronchiale hilfreich sein könnte (Bond u. a. 2007, Lipworth u. a. 2009).

Neben dem Nachweis einer erhöhten Expression von  $\beta_2$ -AR unter der Überexpression von ORMDL3 untersuchten wir in diesem Zusammenhang auch den Einfluss der drei wichtigsten Allele. Im In-Cell-ELISA gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Gesamtexpression der  $\beta_2$ -AR-Varianten in Zellen mit oder ohne ORMDL-Überexpression. Die On-Cell-ELISA-Ratio für  $\beta_2$ -AR wurde hingegen in Abhängigkeit von der  $\beta_2$ -AR-Variante durch eine ORMDL3-Überexpression beeinflusst. Die Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27, nicht aber von  $\beta_2$ -AR-R16/Q27, war signifikant erhöht nach Überexpression von ORMDL3 verglichen mit der Kontrollbedingung, wobei die Zunahme der Oberflächenexpression stärker ausgeprägt war für  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 (3,3-fach) verglichen mit  $\beta_2$ -AR-G16/E27 (1,4-fach) oder  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 (1,3-fach).

ORMDL1, ORMDL2 und ORMDL3 sind in Blutproben von Patienten mit atopischem Asthma stärker exprimiert (Toncheva u. a. 2015). Durch allergene Stimulation kommt es zudem in Mäusen zu einer starken Hochregulierung von ORMDL3 in bronchialen Zellen (Miller u. a. 2012, siehe auch Kapitel 1.2). In Asthmapatienten konnte wiederum gezeigt werden, dass die Hochregulation der ORMDL3-Expression in Patienten ohne vorherige Allergen-Stimulation (Vorerkrankung an allergischer Rhinitis) auf einen neuen allergenen Reiz hin deutlich stärker ist (Toncheva u. a. 2015). Somit ist davon auszugehen, dass Patienten mit atopischem Asthma eine dauerhafte Hochregulation von ORMDL zeigen mit zugleich vermindertem Ansprechen auf neue allergene Reize (Miller u. a. 2012, Toncheva u. a. 2015). Unter der Annahme einer ORMDL3-Funktion als akzessorisches Protein von  $\beta_2$ -AR würde dies beim Allel  $\beta_2$ -AR-G16/Q27 zu einer konstitutiven Überexpression von  $\beta_2$ -AR an der Zelloberfläche führen, die auf einen allergenen Reiz hin jedoch nicht weiter gesteigert werden kann und bei Gabe von Clenbuterol sogar abnehmen könnte. Für das Allel  $\beta_2$ -AR-G16/E27 hatte ORMDL3 einen geringen, aber noch signifikanten Einfluss auf die Oberflächenexpression. Der geringere Einfluss könnte durch die verringerte Bindungsaffinität zwischen ORMDL3 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 bedingt sein. Dafür käme es aber unter einer Therapie mit  $\beta$ -Sympathomimetika nicht zu einem Wirkverlust bei fehlendem Nachweis eines Einflusses der Sympathomimetika auf die Interaktion. Für das Allel  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 schließlich hätte die ORMDL3-Menge aufgrund der geringen, nicht-signifikanten Steigerung der Oberflächenexpression keinen relevanten Einfluss. Wenn wir eine Wirkung von  $\beta$ -Sympathomimetika auf die Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR nachweisen konnten, dann war es eine Schwächung der Bindungsaffinität, was insgesamt zu einer geringeren Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR und somit zur Desensitivierung bei chronischem Gebrauch von  $\beta$ -Sympathomimetika führen könnte. Patienten mit einer hohen Expression von ORMDL3 könnten besonders sensibel für diesen Mechanismus sein, der eine neue Form der Tachyphylaxie unter  $\beta$ -Sympathomimetika-Therapie darstellen würde.

## 4.4 Ausblick zu ORMDL und Asthma

Seit dem Beginn dieser Dissertation hat das Wissen über ORMDL3 bedeutend zugenommen. Damals war einzig seine Assoziation mit einem erhöhten Asthmarisiko beschrieben (Moffatt u. a. 2007) und bestätigt worden (Galanter u. a. 2008, T. Hirota u. a. 2008) und es lag die Erstbeschreibung der *ORMDL*-Genfamilie vor (Hjelmqvist u. a. 2002). 2017 hingegen gibt es über 120 Originalpublikationen, die sowohl die Bestätigung dieser Assoziation als auch mögliche Funktionen der ORMDL-Proteine behandeln. Hinzu kommen die Publikationen zur ORM-Funktion in *Saccharomyces cerevisiae*. Dennoch ist weiterhin völlig offen, welche der aufgezeigten Funktionen der ORMDL-Proteine die Assoziation mit Asthma bronchiale bedingt. In Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen, ein exploratives Interaktom der ORMDL-Proteine zu erstellen, das ihre Einbindung in zahlreiche wichtige Stoffwechselwege stützt und eine Funktion als *date hub* im ER hoch wahrscheinlich macht. Durch die Nutzung unterschiedlicher Hypothesen-getriebener und Hypothesen-freier Ansätze konnte hierbei eine Interaktion von ORMDL mit Proteinen aus diversen subzellulären Funktionen wie dem Calciumstoffwechsel, Chaperonen, dem Fettsäurestoffwechsel oder dem Immunsystem gezeigt werden. Das nachgewiesene ORMDL-Interaktom stellt eine deutliche Erweiterung der bisher bekannten Interaktionen von ORMDL3 mit anderen Proteinen dar. Statt sechs bekannter Interaktionspartner für ORMDL3 sind nun über 50 bekannt. Für ORMDL2 und ORMDL1 handelt es sich um die ersten nachgewiesenen Interaktionen des humanen Interaktoms. Mittlerweile ist auch bekannt, dass Patienten mit Asthma eine erhöhte Expression von ORMDL3 zeigen (Toncheva u. a. 2015), sodass die Anwesenheit einer größeren Menge von ORMDL-Proteinen in der Zelle über diese zahlreichen PPI tatsächlich einen Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozessen haben könnte. Erstmals konnten wir nun zudem zeigen, dass die ORMDL-Proteine direkt mit den Membranrezeptoren interagieren, für die sowohl eine Rolle in der Pathogenese von Asthma bronchiale angenommen wird als auch Funktionen in der Therapie der Erkrankung bekannt sind.

Darunter befindet sich der  $\beta_2$ -AR, für den nachgewiesen werden konnte, dass seine Interaktion mit ORMDL3 sowohl vom Allelstatus abhängig ist als auch durch  $\beta$ -Sympathomimetika moduliert wird. Erstmals konnten wir zudem zeigen, dass in Folge einer ORMDL-Überexpression vermehrt  $\beta_2$ -AR an der Zelloberfläche exprimiert wird. Daraus lässt sich ableiten, dass ORMDL3 möglicherweise als akzessorisches Protein des  $\beta_2$ -AR fungiert und dass eine ORMDL3-Überexpression zu einer verstärkten konstitutionellen Aktivierung von  $\beta_2$ -AR in Patienten mit Asthma bronchiale führt. Dies wiederum könnte sowohl für die Pathogenese als auch die Therapie von Asthma bronchiale von Bedeutung sein. Es sind jedoch weitere Studien notwendig, um die klinische Relevanz der Interaktion von ORMDL3 mit  $\beta_2$ -AR wie auch die Auswirkung der veränderten Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -AR unter dem Einfluss von ORMDL3 zu untersuchen.

Das hier aufgezeigte ORMDL-Interaktom wurden mit einem BRET-System untersucht, das dem aktuellen Stand der Wissenschaft entspricht und parallel zu dieser Arbeit hin zu einem hochautomatisierten Verfahren mit mittlerem Durchsatz (iBRET) weiterentwickelt wurde. Für die hier beschriebenen Interaktionen kann ein hoher positiv

prädikativer Wert angenommen werden und wichtige PPI wie die Homo- und Heterooligomerisierung der ORMDL-Proteine oder die Interaktionen mit dem  $\beta_2$ -AR wurden zudem durch die komplementäre biochemische Methode der Koimmunpräzipitation bestätigt. Dieses Interaktom kann sowohl als Ausgangspunkt für die weitere Entschlüsselung des ORMDL-Interaktoms und der verschiedenen ORMDL-Funktionen dienen wie auch zur Integration neuer Erkenntnisse zu so unterschiedlichen Aspekten wie der ORMDL-Funktion, des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes, des Sphingolipid- oder des Calciumstoffwechsels in einem gemeinsamen ORMDL-Netzwerk. Möglicherweise lassen sich in diesem wachsenden ORMDL-Interaktom in Zukunft Querverbindungen dieser Funktionen oder übergeordnete Steuerungsmechanismen und langfristig vielleicht neue Ansätze zu kausalen Therapiemechanismen für Asthma bronchiale identifizieren. So wurde bereits postuliert, dass innerhalb von Genregulierungsnetzwerken der Asthmapathogenese und -therapie Überlappungen existieren, deren Identifikation zu neuen Möglichkeiten für kausale Therapien führen könnten (Park u. a. 2015) und es gibt auch bereits Versuche, einen Netzwerkphänotyp für Asthma auf Proteom-Ebene oder Genom-Ebene zu erstellen (Y. Chen u. a. 2015, Diao u. a. 2012, Freishtat u. a. 2009, X. M. Gao 2016, Hwang u. a. 2008, Renkonen u. a. 2010, Liu u. a. 2012).

Zusammenfassend konnten wir (1) durch den Nachweis der Homo- und Heterooligomerisierung der ORMDL-Proteinfamilie (Toncheva u. a. 2015) die Hinweise auf die Assoziation der gesamten ORMDL-Proteinfamilie mit Asthma stärken, (2) für die Vielzahl der beschriebenen Proteinfunktionen eine Entsprechung in einem großen und komplexen ORMDL-Interaktom finden, das nicht nur (3) die Lokalisation im ER sowie (4) eine ORMDL-Funktion als *data hub* und (5) im Calcium- und im Sphingolipid-Stoffwechsel stützt, sondern (6) auch direkte PPI zwischen ORMDL und zahlreichen GPCR sowie insbesondere dem  $\beta_2$ -AR enthält, und (7) einen Einfluss von ORMDL3 auf die Oberflächenexpression des  $\beta_2$ -AR, (8) eine Beeinflussung dieser PPI durch die wichtigsten Asthmamedikamente ( $\beta$ -Sympathomimetika) und (9) die relevanten Allele  $\beta_2$ -AR-G16/Q27,  $\beta_2$ -AR-R16/Q27 und  $\beta_2$ -AR-G16/E27 des  $\beta_2$ -AR aufzeigt. Ob ORMDL tatsächlich einen klinisch relevanten Einfluss auf die Wirksamkeit von Sympathomimetika und die Funktion von GPCR wie  $\beta_2$ -AR hat und welche der zahlreichen möglichen Funktionen für die Pathogenese von Asthma relevant sind, wird Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein.

# Kapitel 5

## Anhang

**Tabelle 5.1:** Positiver und zufällig ausgewählter Referenzdatensatz zur Etablierung der BRET-Ratio-Schwellenwerte

Positiver Referenzdatensatz (PRS)		Zufälliger Referenzdatensatz (RRS)	
Protein1	Protein2	Protein1	Protein2
IL8RA	IL8RA	PEX11A	COPS5
IL8RB	IL8RB	PAH	DDOST
IL8RA	IL8RB	ACADM	PEX14
MIF	MIF	KRT17	IL8RB
PEX3	PEX19	Fyn	ACADM
PEX5d	PEX14	Fyn	PEX26
PEX11B	PEX19	ORMDL1	PEX7
PEX12	PEX19	PEX11A	RPS19
PEX13	PEX19	PEX12	PGLYRP1
PEX19	PEX14	KRT17	PAH
ABCD1	PEX19	PEX26	EEF1A1
PEX26	PEX19	PEX14	MIF
DNAJB11	HSPA5	PEX13	IL8
PEX14	PEX14	PXMP3	DDOST
PEX10v1	PEX19	ACADS	PEX10v1
PEX10v1	PEX12	HNRNPK	CYP51A1
PEX5d	PEX12	CXCL2	PEX26
CXCR4	CXCR4	IVD	RPS19
MIF	RPS19	PEX26	HADHA
FOS	Jun	MIF	HADHA
PEX10v2	PEX12	CCL11	PEX6
PEX13	PEX14	PEX13	Jun
PEX11A	PEX19	ACADM	NSDHL
ADRB2	ADRB2	PEX26	ORMDL1
ABCD1	ABCD1	PEX11B	CXCL3
PAH	PAH	RPS19	CCL11

PEX6	PEX26	ORMDL1	PEX19
VDR	VDR	CSNK1G2	NSDHL
PEX14	PEX7	ABCD1	ACADS
PEX13	PEX7	RPS19	CD86
Jun	COPS5	IL8RA	PEX14
PEX5d	PEX10v2	ACADM	ORMDL1
IL8RA	IL8	Fyn	PEX7
IL8RB	IL8	IL10RB	ABCD1
IL8RB	CXCL1	PGLYRP1	COPS5
CXCL2	IL8RB	ADRB2	PEX14
IL8RB	CXCL3	CXCL1	IL10RB
CXCL1	CXCL1	HADHA	PEX5b
SIL1	HSPA5	CXCR4	MRO
PDIA3	CALR	ACADM	PEX6
CCL11	CCR3	CCR3	TBX21
Jun	Jun	NSDHL	CXCL3
Jun	VDR	ACADM	ADRB2
IVD	IVD	CXCL2	Jun
CXCL2	CXCL2	COPS5	IVD
CCL11	CCL11	IL10RB	FOS
XBP1	FOS	PDIA3	CD2
DNAJB9	HSPA5	IL8RA	HNRNPK
HLX	TBX21	IL21R	PEX7
PEX6	PEX5d	ACADM	PXMP3
MIF	IL8RB	PGLYRP1	CD2
COPS5	MIF	ORMDL2	TEAD2
PEX13	PEX5d	CCR3	PAH
PEX10v1	PEX10v1	CXADR	PAH
PEX5d	PEX5d	XBP1	PEX13
MAP2K2	MAP2K2	IVD	DDOST
Fyn	CD2	PEX26	DNAJB11
ACADM	ACADM	HSPA5	PEX11B
PEX10v2	PXMP3	HSP90AB1	IL8
PEX12	PXMP3	PDIA3	TBX21
PEX10v1	PEX5d		



# Kapitel 6

## Abkürzungsverzeichnis

**A549** humane Alveolarzelllinie

**ABCD** *ATP-binding cassette, sub-family D*

**A $\beta$**   $\beta$ -Amyloid

**ACSL** *Acyl-CoA synthase long chain family*

**ADORA** Adenosinrezeptor A

**ADRB2**  $\beta_2$ -Adrenorezeptor

**cAMP** Cyclisches Adenosinmonophosphat

**APH1** *anterior pharynx defective 1 homologue*

**APP** Amyloid-Vorläuferprotein (*Amyloid precursor protein*)

**ARF** ADP-Ribosylationsfaktor

**ATF** aktivierender Transkriptionsfaktor

**$\beta_2$ -AR**  $\beta_2$ -Adrenorezeptor

**BIP** siehe HSP

**BRET** Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer

**BRET<sub>max</sub>** Plateau der BRET-Ratio in den Sättigungsexperimenten

**BRET<sub>50</sub>** Akzeptor/Donor-Verhältnis der halbmaximalen BRET-Ratio als Maß der relativen Bindungsaffinität

**iBRET** *informatics aided BRET*

**CALR** Calreticulin

**CANX** Calnexin

**CCL** Chemokin-(C-C Motiv)-Ligand

**CCR** Chemokin-(C-C Motiv)-Rezeptor

**CD** Unterscheidungsgruppen (*clusters of differentiation*)

**CHRM** Muskarinische Acetylcholinrezeptor

**CO** Medianer Luciferase-Schwellenwert nach Kreuzvalidierung

**Co-IP** Koimmunpräzipitation (*Co-Immunoprecipitation*)

**COS-7** Fibroblasten-Nierenzelllinie der grünen Meerkatze (*CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40*)

**CTZ** Coelenterazin

**CXADR** *Coxsackievirus and adenovirus receptor*

**CXCR** Chemokin-(C-X-C Motiv)-Rezeptor

**CYSLTR** Cysteinyl-Leukotrienrezeptor

**DDOST** Dolichyldiphosphooligosaccharid-Protein-Glycosyltransferase

**DNA** Desoxyribonukleinsäure

**DNAJB** *DNAJ-domain-binding protein*

**cDNA** komplementäre DNS

**dsDNA** Doppelstrang-DNA

**DTT** Dichlordiphenyltrichlorethan

**eIF2 $\alpha$**  *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*

**ELISA** *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

**EMAPS** *Epistatic Mini-Array Profiles*

**ER** Endoplasmatisches Reticulum

**ERAD** ER-assoziierte Proteindegradation

**ERp57** siehe PDIA3

**FEV1** Einsekundenkapazität

**FKBP1A** *FK506 binding protein 1A*

**FRET** Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer

**GFP** grün-fluoreszierendes Protein

**GM-CSF** Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor

**GOS2R** *G0/G1 switch 2 protein*

**GPCR** G-Protein-gekoppelter Rezeptor

**GTP** Guanosintriphosphat

**GWAS** genomweite Assoziationsstudie

**HA** Hämagglutinin

**HBSMC** Humane bronchiale glatte Muskelzellen

**HEK-293** Humane embryonale Nierenzellen 293

**HRP** Meerrettichperoxidase

**HSP** Hitzeschockproteine

**ICON** *International Consensus on Paediatric Asthma*

**IL** Interleukin

**IL2R** IL-2 Rezeptor

**IL10R** IL-10 Rezeptor

**IL12R** IL-12 Rezeptor

**IL17R** IL-17 Rezeptor

**IL21R** IL-21 Rezeptor

**IL23R** IL-23 Rezeptor

**IRE1** *inositol-requiring enzyme 1*

**JAK-STAT** *janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway*

**JNK** C-Jun-N-terminale Kinase

**KDEL** *KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptors*

**LCB** langkettige Basen

- LCB1** Serin Palmitoyltransferase LCB Untereinheit 1
- LCB2** Serin Palmitoyltransferase LCB Untereinheit 2
- LDS** Lithiumlaurylsulfat
- LMAN2** Mannose-bindendes Lectin 2
- LT** Medianer unterer Schwellenwert nach Kreuzvalidierung
- MCAD** Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase
- MFN2** Mitofusin-2
- MGC** *Mammalian Gene Collection*
- NF $\kappa$ B** *nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
- OLR** Offener Leserahmen
- OPRD1** Opioidrezeptor  $\delta$ -1
- ORMDL** ORM-ähnliches Protein (*ORM-like protein*)
- ORMDL1** ORM-ähnliches Protein 1
- ORMDL2** ORM-ähnliches Protein 2
- ORMDL3** ORM-ähnliches Protein 3
- ORM** Orosomucoid
- ORM1** Orosomucoid 1
- ORM2** Orosomucoid 2
- PAH** Phenylalaninhydroxylase
- PAR2** *Protease-activated receptor 2*
- PCR** Polymerase-Kettenreaktion
- PDIA3** *protein disulfide isomerase family A member 3*
- PEF** Expiratorischer Spitzenfluss
- PEN2** *presenilin enhancer 2*
- PERK** siehe eIF2 $\alpha$
- PEX** peroxisomaler Biogenesefaktor

**PPI** Protein-Protein-Interaktion

**PSEN1** Presinilin 1

**Rab** Rab(*Ras-related in brain*)-Protein

**RLU** Relative Lichteinheit (*relative light unit*)

**hRluc** humanisierte Renilla Luciferase

**siRNA** *Small interfering* RNA

**mRNA** Boten-RNA

**RORC** *RAR related orphan receptor C*

**ROS** *ROS proto-oncogene 1 receptor tyrosine kinase*

**RRS** zufälliger Referenzdatensatz (*random reference set*)

**RT** Raumtemperatur

**S100A8** *S100 calcium binding protein A8*

**SAC1** Phosphatidylinositol-3-Phosphatase SAC1

**SAR1** Sekretions-assoziierte Ras-verwandete GTPase 1

**SDM** ortsspezifische Mutagenese

**SEC61A1** *Protein Transport Protein Sec61 Subunit  $\alpha$  Isoform 1*

**SEC22B** SEC22 Homolog B

**SERCA** Sarcoplasmatisches/Endoplasmatisches Reticulum Calcium-ATPase

**SERP1** Stress-assoziiertes ER-Protein 1

**SLC25A17** *Solute Carrier Family 25 Member 17*

**SNP** Einzelnukleotid-Polymorphismen

**SPOTS** SPOTS: Komplex aus SPT, Orm1/2, Tsc3 und Sac1

**SPT** Serin-Palmitoyltransferase

**SPTLC1** *Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 1*

**SSR1** *signal sequence receptor*

**STAT** *signal transducer and activator of transcription protein*

**Th** T-Helferzelle

**TRAPPC2** *trafficking protein particle complex 2*

**Treg** Regulatorische T-Zelle

**TSC3** *serine palmitoyltransferase-regulating protein TSC3*

**TSLP** *Thymic stromal lymphopoietin*

**UPR** *Unfolded Protein Response*

**UT** Medianer oberer Schwellenwert nach Kreuzvalidierung

**V5** V5-Protein-Tag

**VDAC** *Voltage-dependent anion-selective channel*

**XPB** *X-box binding protein*

**YFP** gelb-fluoreszierendes Protein

**YPK1** *Serine/threonine-protein kinase YPK1*

**ZDHHC3** *zinc finger, DHHC-type containing protein 3*

## Kapitel 7

### Danksagung

Ich danke meiner Frau Liliane Santana und meinen Eltern für ihre Geduld und ihre bedingungslose Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation. Ich danke weiterhin Prof. Dr. med. Ania Muntau, Prof. Dr. med. Søren Gersting und insbesondere auch Dr. med. Amelie Lotz und Mathias Woidy für die freundschaftliche und intensive Betreuung und Unterstützung während der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Doktorarbeit. Schließlich danke ich auch allen anderen Mitgliedern der *AG Molekulare Pädiatrie* für die langjährige Zusammenarbeit und Prof. Dr. Wolfgang Schliebs und Prof. Dr. Ralf Erdmann für die Durchführung der Komplexisolierungen von ORMDL3.

# Kapitel 8

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, Julian Malte Klingbeil, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*ORM-like protein* (ORMDL) - Annäherung an die Funktion über die Interaktion“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Leipzig, den 16.10.2019  
Ort, Datum

Julian Klingbeil  
Unterschrift Doktorand



# Literatur

- Adams, M. D. u. a. (2000). „The genome sequence of *Drosophila melanogaster*“. In: *Science (New York, N.Y.)* 287.5461, S. 2185–2195. ISSN: 0036-8075.
- Ahn, S.-M. u. a. (2009). „The first Korean genome sequence and analysis: full genome sequencing for a socio-ethnic group“. In: *Genome research* 19.9, S. 1622–1629. ISSN: 1549-5469.
- Aken, B. L. u. a. (2016). „The Ensembl gene annotation system“. In: *Database : the journal of biological databases and curation* 2016. ISSN: 1758-0463.
- Akinbami, L. J., J. E. Moorman, C. Bailey, H. S. Zahran, M. King, C. A. Johnson und X. Liu (2012). „Trends in asthma prevalence, health care use, and mortality in the United States, 2001-2010“. In: *NCHS data brief* 94, S. 1–8. ISSN: 1941-4927.
- Altmüller, J., L. J. Palmer, G. Fischer, H. Scherb und M. Wjst (2001). „Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find“. In: *American journal of human genetics* 69.5, S. 936–950. ISSN: 0002-9297.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990). „Basic local alignment search tool“. In: *Journal of Molecular Biology* 215.3, S. 403–410. ISSN: 00222836.
- Andorf, C. M., V. Honavar und T. Z. Sen (2013). „Predicting the binding patterns of hub proteins: a study using yeast protein interaction networks“. In: *PLoS ONE* 8.2, e56833. ISSN: 1932-6203.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis und M. Bouvier (2000). „Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.7, S. 3684–3689. ISSN: 0027-8424.
- Ano, S. u. a. (2013). „Transcription factors GATA-3 and RORgt are important for determining the phenotype of allergic airway inflammation in a murine model of asthma“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190.3, S. 1056–1065. ISSN: 1550-6606.
- Apter, A. J. (2013). „Advances in adult asthma diagnosis and treatment in 2012: potential therapeutics and gene-environment interactions“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 131.1, S. 47–54. ISSN: 1097-6825.
- Araki, W. u. a. (2007). „A family of membrane proteins associated with presenilin expression and -secretase function“. In: *The FASEB Journal* 22.3, S. 819–827. ISSN: 0892-6638.
- Asano, K. u. a. (2010). „Association between b-adrenoceptor gene polymorphisms and relative response to b2-agonists and anticholinergic drugs in Japanese asthmatic patients“. In: *Respirology* 15.5, S. 849–854. ISSN: 13237799.

- Ashburner, M. u. a. (2000). „Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium“. In: *Nature genetics* 25.1, S. 25–29. ISSN: 1546-1718.
- Ashley, E. A. u. a. (2010). „Clinical assessment incorporating a personal genome“. In: *The Lancet* 375.9725, S. 1525–1535. ISSN: 01406736.
- Avery, O. T., C. M. Macleod und M. McCarty (1944). „Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isoated from pneumococcuc type IIIA“. In: *The Journal of experimental medicine* 79.2, S. 137–158. ISSN: 0022-1007.
- Ayoub, M. A. (2002). „Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.24, S. 21522–21528. ISSN: 0021-9258.
- Ayoub, M. A. und K. D. G. Pfleger (2010). „Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization“. In: *Current Opinion in Pharmacology* 10.1, S. 44–52. ISSN: 14714892.
- Bader, G. D. (2003). „BIND: The Biomolecular Interaction Network Database“. In: *Nucleic acids research* 31.1, S. 248–250. ISSN: 0305-1048.
- Bagnasco, D., M. Ferrando, S. Bernardi, G. Passalacqua und G. W. Canonica (2016). „The path to personalized medicine in asthma“. In: *Expert review of respiratory medicine*, S. 1–9. ISSN: 1747-6356.
- Baldini, M., I. C. Lohman, M. Halonen, R. P. Erickson, P. G. Holt und F. D. Martinez (1999). „A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E“. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20.5, S. 976–983. ISSN: 1044-1549.
- Barabási, A. L., N. Gulbahce und J. Loscalzo (2011). „Network medicine: a network-based approach to human disease“. In: *Nature reviews. Genetics* 12.1, S. 56–68. ISSN: 1471-0064.
- Barnes, P. J. (2002). „Cytokine modulators as novel therapies for asthma“. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 42, S. 81–98. ISSN: 0362-1642.
- Basu, K., C. N. Palmer, R. Tavendale, B. J. Lipworth und S. Mukhopadhyay (2009). „Adrenergic b2-receptor genotype predisposes to exacerbations in steroid-treated asthmatic patients taking frequent albuterol or salmeterol“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124.6, 1188–1194.e3. ISSN: 00916749.
- Berger, P., D. W. Perng, H. Thabrew, S. J. Compton, J. A. Cairns, A. R. McEuen, R. Marthan, Tunon De Lara, J M und A. F. Walls (2001). „Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells“. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 91.3, S. 1372–1379. ISSN: 8750-7587.
- Bernales, S., F. R. Papa und P. Walter (2006). „Intracellular signaling by the unfolded protein response“. In: *Annual review of cell and developmental biology* 22, S. 487–508. ISSN: 1081-0706.
- Berridge, M. J., P. Lipp und M. D. Bootman (2000). „The versatility and universality of calcium signalling“. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 1.1, S. 11–21. ISSN: 1471-0072.

- Bharti, P. u. a. (2011). „PEX14 is required for microtubule-based peroxisome motility in human cells“. In: *Journal of Cell Science* 124.Pt 10, S. 1759–1768. ISSN: 0021-9533.
- Bijlmakers, M. J. und M. Marsh (2003). „The on-off story of protein palmitoylation“. In: *Trends in Cell Biology* 13.1, S. 32–42. ISSN: 09628924.
- Binia, A. und M. Kabesch (2012). „Respiratory medicine - genetic base for allergy and asthma“. In: *Swiss Medical Weekly*. ISSN: 1424-7860.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA“. In: *Nucleic acids research* 7.6, S. 1513–1523. ISSN: 0305-1048.
- Bisgaard, H., S. M. Jensen und K. Bønnelykke (2012). „Interaction between asthma and lung function growth in early life“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 185.11, S. 1183–1189. ISSN: 1535-4970.
- Bisgaard, H. u. a. (2009). „Chromosome 17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 179.3, S. 179–185. ISSN: 1535-4970.
- Bishop, G. A. und J. Hwang (1992). „Use of a cellular ELISA for the detection of cell surface antigens“. In: *BioTechniques* 12.3, S. 326–330. ISSN: 0736-6205.
- Bjorck, L. und G. Kronvall (1984). „Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133.2, S. 969–974. ISSN: 1550-6606.
- Blake, K. und J. Lima (2015). „Pharmacogenomics of long-acting b2-agonists“. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, S. 1–19. ISSN: 1744-7607.
- Bleecker, E. R., D. S. Postma, R. M. Lawrance, D. A. Meyers, H. J. Ambrose und M. Goldman (2007). „Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting b2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies“. In: *The Lancet* 370.9605, S. 2118–2125. ISSN: 01406736.
- Bleecker, E. R., H. S. Nelson, M. Kraft, J. Corren, D. A. Meyers, S. W. Yancey, W. H. Anderson, A. H. Emmett und H. G. Ortega (2010). „b 2 -Receptor Polymorphisms in Patients Receiving Salmeterol with or without Fluticasone Propionate“. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181.7, S. 676–687. ISSN: 1073-449X.
- Blumenthal, M. N. (2012). „Genetic, epigenetic, and environmental factors in asthma and allergy“. In: *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 108.2, S. 69–73. ISSN: 1081-1206.
- Boehler, R. M., R. Kuo, S. Shin, A. G. Goodman, M. A. Pilecki, R. M. Gower, J. N. Leonard und L. D. Shea (2014). „Lentivirus delivery of IL-10 to promote and sustain macrophage polarization towards an anti-inflammatory phenotype“. In: *Biotechnology and bioengineering* 111.6, S. 1210–1221. ISSN: 1097-0290.
- Böhm, L. u. a. (2015). „IL-10 and regulatory T cells cooperate in allergen-specific immunotherapy to ameliorate allergic asthma“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194.3, S. 887–897. ISSN: 1550-6606.
- Bond, R. A., D. Spina, S. Parra und C. P. Page (2007). „Getting to the heart of asthma: can "beta blockers" be useful to treat asthma?“ In: *Pharmacology & Therapeutics* 115.3, S. 360–374. ISSN: 01637258.

- Bousquet, J., Clark, T. J. H., S. Hurd, N. Khaltaev, C. Lenfant, P. O'Byrne und A. Sheffer (2007). „GINA guidelines on asthma and beyond“. In: *Allergy* 62.2. ISSN: 01054538.
- Bouzigon, E. u. a. (2008). „Effect of 17q21 Variants and Smoking Exposure in Early-Onset Asthma“. In: *New England Journal of Medicine* 359.19, S. 1985–1994. ISSN: 0028-4793.
- Brand, P. L. P., M. J. Makela, S. J. Szeffler, T. Frischer und D. Price (2015). „Monitoring asthma in childhood: symptoms, exacerbations and quality of life“. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 24.136, S. 187–193. ISSN: 0905-9180.
- Braun, P. u. a. (2008). „An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions“. In: *Nature Methods* 6.1, S. 91–97. ISSN: 1548-7091.
- Breslow, D. K., S. R. Collins, B. Bodenmiller, R. Aebersold, K. Simons, A. Shevchenko, C. S. Ejsing und J. S. Weissman (2010). „Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis“. In: *Nature* 463.7284, S. 1048–1053. ISSN: 0028-0836.
- Brown, M. K. und N. Naidoo (2012). „The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases“. In: *Frontiers in physiology* 3, S. 263. ISSN: 1664-042X.
- Bubnell, J., P. Pfister, M. L. Sapor, M. E. Rogers und P. Feinstein (2013). „b2 adrenergic receptor fluorescent protein fusions traffic to the plasma membrane and retain functionality“. In: *PLoS ONE* 8.9, e74941. ISSN: 1932-6203.
- Buchholz, F., L. Ringrose, P. O. Angrand, F. Rossi und A. F. Stewart (1996). „Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination“. In: *Nucleic acids research* 24.21, S. 4256–4262. ISSN: 0305-1048.
- Bugajev, V., I. Halova, L. Draberova, M. Bambouskova, L. Potuckova, H. Draberova, T. Paulenda, S. Junyent und P. Draber (2015). „Negative regulatory roles of ORMDL3 in the FcεRI-triggered expression of proinflammatory mediators and chemotactic response in murine mast cells“. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. ISSN: 1420-9071.
- Bush, A. (2015). „Montelukast in paediatric asthma: where we are now and what still needs to be done“. In: *Paediatric respiratory reviews* 16.2, S. 97–100. ISSN: 1526-0550.
- Butchers, P. R., C. J. Vardey und M. Johnson (1991). „Salmeterol: a potent and long-acting inhibitor of inflammatory mediator release from human lung“. In: *British Journal of Pharmacology* 104.3, S. 672–676. ISSN: 00071188.
- Calebiro, D., F. Rieken, J. Wagner, T. Sungkaworn, U. Zabel, A. Borzi, E. Cocucci, A. Zürn und M. J. Lohse (2013). „Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.2, S. 743–748. ISSN: 1091-6490.
- Calton, M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark und D. Ron (2002). „IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA“. In: *Nature* 415.6867, S. 92–96. ISSN: 0028-0836.
- Callaerts-Vegh, Z., K. L. Evans, N. Dudekula, D. Cuba, B. J. Knoll, P. F. Callaerts, H. Giles, F. R. Shardonofsky und R. A. Bond (2004). „Effects of acute and chronic administration of beta-adrenoceptor ligands on airway function in a murine model of asthma“. In:

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.14, S. 4948–4953. ISSN: 1091-6490.
- Campbell, J. D. und K. T. HayGlass (2000). „T cell chemokine receptor expression in human Th1- and Th2-associated diseases“. In: *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 48.6, S. 451–456. ISSN: 0004-069X.
- Cantero-Recasens, G., C. Fandos, F. Rubio-Moscardo, M. A. Valverde und R. Vicente (2009). „The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress“. In: *Human Molecular Genetics* 19.1, S. 111–121. ISSN: 1460-2083.
- Cao, T. T., A. Brelot und M. von Zastrow (2005). „The composition of the beta-2 adrenergic receptor oligomer affects its membrane trafficking after ligand-induced endocytosis“. In: *Molecular Pharmacology* 67.1, S. 288–297. ISSN: 0026-895X.
- Carreras-Sureda, A., G. Cantero-Recasens, F. Rubio-Moscardo, K. Kiefer, C. Peinelt, B. A. Niemeyer, M. A. Valverde und R. Vicente (2013). „ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation“. In: *Human Molecular Genetics* 22.3, S. 519–530. ISSN: 1460-2083.
- Carroll, C. L., P. Stoltz, C. M. Schramm und A. R. Zucker (2009). „Beta2-adrenergic receptor polymorphisms affect response to treatment in children with severe asthma exacerbations“. In: *Chest* 135.5, S. 1186–1192. ISSN: 0012-3692.
- Catley, M. C., J. Coote, M. Bari und K. L. Tomlinson (2011). „Monoclonal antibodies for the treatment of asthma“. In: *Pharmacology & Therapeutics* 132.3, S. 333–351. ISSN: 01637258.
- Cazzoletti, L. u. a. (2007). „Asthma control in Europe: a real-world evaluation based on an international population-based study“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 120.6, S. 1360–1367. ISSN: 1097-6825.
- Chatterjee, R., J. Batra und B. Ghosh (2009). „A common exonic variant of interleukin21 confers susceptibility to atopic asthma“. In: *International archives of allergy and immunology* 148.2, S. 137–146. ISSN: 1423-0097.
- Chen, E., R. C. Strunk, L. B. Bacharier, M. Chan und G. E. Miller (2010). „Socioeconomic status associated with exhaled nitric oxide responses to acute stress in children with asthma“. In: *Brain, behavior, and immunity* 24.3, S. 444–450. ISSN: 1090-2139.
- Chen, M.-H., C.-T. Li, C.-F. Tsai, W.-C. Lin, W.-H. Chang, T.-J. Chen, T.-L. Pan, T.-P. Su und Y.-M. Bai (2014). „Risk of dementia among patients with asthma: a nationwide longitudinal study“. In: *Journal of the American Medical Directors Association* 15.10, S. 763–767. ISSN: 1538-9375.
- Chen, J. M., C. Férec und D. N. Cooper (2010). „Revealing the human mutome“. In: *Clinical genetics* 78.4, S. 310–320. ISSN: 1399-0004.
- Chen, Y. und J. Qiao (2015). „Protein-protein interaction network analysis and identifying regulation microRNAs in asthmatic children“. In: *Allergologia et immunopathologia* 43.6, S. 584–592. ISSN: 0301-0546.
- Chesne, J., F. Braza, G. Mahay, S. Brouard, M. Aronica und A. Magnan (2014). „IL-17 in severe asthma. Where do we stand“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 190.10, S. 1094–1101. ISSN: 1535-4970.

- Chong, J. X. u. a. (2015). „The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities“. In: *American journal of human genetics* 97.2, S. 199–215. ISSN: 0002-9297.
- Choudhry, S. u. a. (2005). „Pharmacogenetic differences in response to albuterol between Puerto Ricans and Mexicans with asthma“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 171.6, S. 563–570. ISSN: 1535-4970.
- Chung, L. P., G. Waterer und P. J. Thompson (2011). „Pharmacogenetics of b2 adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting b-agonists and asthma“. In: *Clinical & Experimental Allergy* 41.3, S. 312–326. ISSN: 09547894.
- Ciaccio, C. E., A. DiDonna, K. Kennedy, C. S. Barnes, J. M. Portnoy und L. J. Rosenwasser (2014). „Secondhand tobacco smoke exposure in low-income children and its association with asthma“. In: *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 35.6, S. 462–466. ISSN: 1539-6304.
- Clancy, T. und E. Hovig (2014). „From proteomes to complexomes in the era of systems biology“. In: *PROTEOMICS* 14.1, S. 24–41. ISSN: 16159853.
- Coca, A. F. und R. A. Cooke (1923). „On the Classification of the Phenomena of Hypersensitiveness“. In: *The Journal of Immunology* 8.3, S. 163–182. ISSN: 0022-1767.
- Contopoulos, D., E. Manoli und J. Ioannidis (2005). „Meta-analysis of the association of b2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115.5, S. 963–972. ISSN: 00916749.
- Cooper, D. N. und H. Kehrer-Sawatzki (2011). „Exploring the potential relevance of human-specific genes to complex disease“. In: *Human genomics* 5.2, S. 99–107. ISSN: 1473-9542.
- Cooperstein, S. J. und A. Lazarow (1953). „Studies on the mechanism of Janus Green B staining of mitochondria“. In: *Experimental Cell Research* 5.1, S. 82–97. ISSN: 00144827.
- Corren, J. (2013). „Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification“. In: *Discovery medicine* 15.83, S. 243–249. ISSN: 1539-6509.
- Costa, L. D., P. S. Costa und P. A. M. Camargos (2014). „Exacerbation of asthma and airway infection: is the virus the villain“. In: *Jornal de pediatria* 90.6, S. 542–555. ISSN: 0021-7557.
- Cumberworth, A., G. Lamour, M. M. Babu und J. Gsponer (2013). „Promiscuity as a functional trait: intrinsically disordered regions as central players of interactomes“. In: *Biochemical Journal* 454.3, S. 361–369. ISSN: 02646021.
- Cunningham, F. u. a. (2015). „Ensembl 2015“. In: *Nucleic acids research* 43.Database issue, S. D662–9. ISSN: 0305-1048.
- Cusick, M. E. u. a. (2009). „Literature-curated protein interaction datasets“. In: *Nature Methods* 6.1, S. 39–46. ISSN: 1548-7091.
- Custovic, A., S. Marinho und A. Simpson (2012). „Gene-environment interactions in the development of asthma and atopy“. In: *Expert review of respiratory medicine* 6.3, S. 301–308. ISSN: 1747-6356.
- Dacres, H., J. Wang, M. M. Dumancic und S. C. Trowell (2010). „Experimental determination of the Förster distance for two commonly used bioluminescent resonance energy transfer pairs“. In: *Analytical chemistry* 82.1, S. 432–435. ISSN: 1520-6882.

- Dales, R. E., B. Choi, Y. Chen und M. Tang (2002). „Influence of family income on hospital visits for asthma among Canadian school children“. In: *Thorax* 57.6, S. 513–517. ISSN: 00406376.
- Danna, K. und D. Nathans (1999). „Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae. 1971“. In: *Reviews in medical virology* 9.2, S. 75–81. ISSN: 1099-1654.
- Darveaux, J. und W. W. Busse (2015). „Biologics in asthma—the next step toward personalized treatment“. In: *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 3.2, 152–60, quiz 161. ISSN: 2213-2201.
- Davel, A. P., P. C. Brum und L. V. Rossoni (2014). „Isoproterenol induces vascular oxidative stress and endothelial dysfunction via a Gialpha-coupled beta2-adrenoceptor signaling pathway“. In: *PLoS ONE* 9.3, e91877. ISSN: 1932-6203.
- Davis, B. und J. A. Nadel (1980). „New methods used to investigate the control of mucus secretion and ion transport in airways“. In: *Environmental health perspectives* 35, S. 121–130. ISSN: 0091-6765.
- de Nijs, S. B., L. N. Venekamp und E. H. Bel (2013). „Adult-onset asthma: is it really different“. In: *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 22.127, S. 44–52. ISSN: 0905-9180.
- De, A., P. Ray, A. M. Loening und S. S. Gambhir (2009). „BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals“. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23.8, S. 2702–2709. ISSN: 1530-6860.
- den Dekker, H. T., A. M. Sonnenschein-van der Voort, J. C. de Jongste, I. K. Reiss, A. Hofman, V. W. V. Jaddoe und L. Duijts (2015). „Tobacco Smoke Exposure, Airway Resistance, and Asthma in School-age Children: The Generation R Study“. In: *Chest* 148.3, S. 607–617. ISSN: 0012-3692.
- Denham, S., G. H. Koppelman, J. Blakey, M. Wjst, M. A. Ferreira, I. P. Hall und I. Sayers (2008). „Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits“. In: *Respiratory Research* 9.1, S. 38. ISSN: 1465-9921.
- Devalia, J. L., R. J. Sapsford, C. Rusznak, M. J. Toumbis und R. J. Davies (1992). „The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, in vitro“. In: *Pulmonary Pharmacology* 5.4, S. 257–263. ISSN: 09520600.
- Diao, B., Y. Liu, Y. Zhang, Q. Liu, W.-J. Lu und G. Xu (2012). „Functional network analysis with the subcellular location and gene ontology information in human allergic asthma“. In: *Genetic testing and molecular biomarkers* 16.11, S. 1287–1292. ISSN: 1945-0257.
- Dijk, F. N., de Jongste, Johan C., D. S. Postma und G. H. Koppelman (2013). „Genetics of onset of asthma“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 13.2, S. 193–202. ISSN: 1528-4050.

- DiLella, A. G. (1991). „Chromosomal assignment of the human immunophilin FKBP-12 gene“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179.3, S. 1427–1433. ISSN: 0006291X.
- Dinkel, H. u. a. (2014). „The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting“. In: *Nucleic acids research* 42.Database issue, S. D259–66. ISSN: 0305-1048.
- Djukanovic, R. u. a. (1997). „The effect of treatment with oral corticosteroids on asthma symptoms and airway inflammation“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 155.3, S. 826–832. ISSN: 1535-4970.
- Dold, S., M. Wjst, E. von Mutius, P. Reitmeir und E. Stiepel (1992). „Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis“. In: *Archives of disease in childhood* 67.8, S. 1018–1022. ISSN: 1468-2044.
- Dominguez-Ortega, J., E. Phillips-Angles, P. Barranco und S. Quirce (2015). „Cost-effectiveness of asthma therapy: a comprehensive review“. In: *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 52.6, S. 529–537. ISSN: 1532-4303.
- Dong, C., L. Yang, X. Zhang, H. Gu, M. L. Lam, W. C. Claycomb, H. Xia und G. Wu (2010). „Rab8 Interacts with Distinct Motifs in 2B- and 2-Adrenergic Receptors and Differentially Modulates Their Transport“. In: *Journal of Biological Chemistry* 285.26, S. 20369–20380. ISSN: 0021-9258.
- Dong, C., F. Zhou, E. K. Fugetta, C. M. Filipeanu und G. Wu (2008). „Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase“. In: *Cellular Signalling* 20.6, S. 1035–1043. ISSN: 08986568.
- Dosztányi, Z., V. Csizmok, P. Tompa und I. Simon (2005). „IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content“. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 21.16, S. 3433–3434. ISSN: 1367-4803.
- Drazen, J. M., E. K. Silverman und T. H. Lee (2000). „Heterogeneity of therapeutic responses in asthma“. In: *British medical bulletin* 56.4, S. 1054–1070. ISSN: 0007-1420.
- Drysdale, C. M., D. W. McGraw, C. B. Stack, J. C. Stephens, R. S. Judson, K. Nandabalan, K. Arnold, G. Ruano und S. B. Liggett (2000). „Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.19, S. 10483–10488. ISSN: 0027-8424.
- Dyson, J. H. und P. E. Wright (2005). „Intrinsically unstructured proteins and their functions“. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6.3, S. 197–208. ISSN: 1471-0072.
- Edwards, S. L., J. Beesley, J. D. French und A. M. Dunning (2013). „Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function“. In: *American journal of human genetics* 93.5, S. 779–797. ISSN: 0002-9297.
- Ege, M. J., M. Mayer, A.-C. Normand, J. Genuneit, W. O. Cookson, C. Braun-Fahrlander, D. Heederik, R. Piarroux und E. von Mutius (2011). „Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma“. In: *The New England journal of medicine* 364.8, S. 701–709. ISSN: 1533-4406.
- Ekman, D., S. Light, A. K. Björklund und A. Elofsson (2006). „What properties characterize the hub proteins of the protein-protein interaction network of *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Genome biology* 7.6, R45. ISSN: 1465-6914.



- Engvall, E. und P. Perlmann (1971). „Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G“. In: *Immunochemistry* 8.9, S. 871–874. ISSN: 00192791.
- Evans, W. E. und H. L. McLeod (2003). „Pharmacogenomics–drug disposition, drug targets, and side effects“. In: *The New England journal of medicine* 348.6, S. 538–549. ISSN: 1533-4406.
- Fahy, J. V. (2015). „Type 2 inflammation in asthma–present in most, absent in many“. In: *Nature reviews. Immunology* 15.1, S. 57–65. ISSN: 1474-1741.
- Fahy, J. V., D. B. Corry und H. A. Boushey (2000). „Airway inflammation and remodeling in asthma“. In: *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 6.1, S. 15–20. ISSN: 1070-5287.
- Fajt, M. L. und S. E. Wenzel (2014). „Biologic therapy in asthma: entering the new age of personalized medicine“. In: *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 51.7, S. 669–676. ISSN: 1532-4303.
- Fang, Q., H. Zhao, A. Wang, Y. Gong und Q. Liu (2011). „Association of genetic variants in chromosome 17q21 and adult-onset asthma in a Chinese Han population“. In: *BMC medical genetics* 12, S. 133. ISSN: 1471-2350.
- Farber, H. J., R. R. Batsell, E. A. Silveira, R. T. Calhoun und A. P. Giardino (2016). „The Impact of Tobacco Smoke Exposure on Childhood Asthma in a Medicaid Managed Care Plan“. In: *Chest* 149.3, S. 721–728. ISSN: 0012-3692.
- Ferkol, T. und D. Schraufnagel (2014). „The Global Burden of Respiratory Disease“. In: *Annals of the American Thoracic Society* 11.3, S. 404–406. ISSN: 2329-6933.
- Ferrante, G., R. Antona, V. Malizia, L. Montalbano, G. Corsello und S. La Grutta (2014). „Smoke exposure as a risk factor for asthma in childhood: a review of current evidence“. In: *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 35.6, S. 454–461. ISSN: 1539-6304.
- Ferreira, M. A. R. u. a. (2014). „Genome-wide association analysis identifies 11 risk variants associated with the asthma with hay fever phenotype“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 133.6, S. 1564–1571. ISSN: 1097-6825.
- Ferron, F., S. Longhi, B. Canard und D. Karlin (2006). „A practical overview of protein disorder prediction methods“. In: *Proteins* 65.1, S. 1–14. ISSN: 1097-0134.
- Filipeanu, C. M., F. Zhou, E. K. Fugetta und G. Wu (2006). „Differential regulation of the cell-surface targeting and function of beta- and alpha1-adrenergic receptors by Rab1 GTPase in cardiac myocytes“. In: *Molecular Pharmacology* 69.5, S. 1571–1578. ISSN: 0026-895X.
- Fitzpatrick, A. M., C. E. Baena-Cagnani und L. B. Bacharier (2012). „Severe asthma in childhood: recent advances in phenotyping and pathogenesis“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 12.2, S. 193–201. ISSN: 1528-4050.
- Flavell, R. A., D. L. Sabo, E. F. Bandle und C. Weissmann (1975). „Site-directed mutagenesis: Effect of an extracistronic mutation on the in vitro propagation of bacteriophage Qbeta RNA“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72.1, S. 367–371. ISSN: 0027-8424.
- Flory, J. H. u. a. (2009). „17q12-21 variants interact with smoke exposure as a risk factor for pediatric asthma but are equally associated with early-onset versus late-onset

- asthma in North Americans of European ancestry". In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 124.3, S. 605–607. ISSN: 1097-6825.
- Fowler, S. J., O. J. Dempsey, E. J. Sims und B. J. Lipworth (2000). „Screening for bronchial hyperresponsiveness using methacholine and adenosine monophosphate. Relationship to asthma severity and beta(2)-receptor genotype". In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 162.4 Pt 1, S. 1318–1322. ISSN: 1535-4970.
- Freishtat, R. J., A. S. Benton, A. M. Watson, Z. Wang, M. C. Rose und E. P. Hoffman (2009). „Delineation of a gene network underlying the pulmonary response to oxidative stress in asthma". In: *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 57.7, S. 756–764. ISSN: 1081-5589.
- Fukui, Y. (2006). „Association Between Nonspecific Airway Hyperresponsiveness and Arg16Gly 2-Adrenergic Receptor Gene Polymorphism in Asymptomatic Healthy Japanese Subjects". In: *Chest* 130.2, S. 449–454. ISSN: 0012-3692.
- Fung, J. J., X. Deupi, L. Pardo, X. J. Yao, G. A. Velez-Ruiz, B. T. Devree, R. K. Sunahara und B. K. Kobilka (2009). „Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer". In: *The EMBO journal* 28.21, S. 3315–3328. ISSN: 0261-4189.
- Futamura, K. u. a. (2010). „beta2-Adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells". In: *International archives of allergy and immunology* 152.4, S. 353–361. ISSN: 1423-0097.
- Galanter, J. u. a. (2008). „ORMDL3 Gene Is Associated with Asthma in Three Ethnically Diverse Populations". In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177.11, S. 1194–1200. ISSN: 1073-449X.
- Galli, S. J. und M. Tsai (2012). „IgE and mast cells in allergic disease". In: *Nature medicine* 18.5, S. 693–704. ISSN: 1078-8956.
- Galli, S. J., M. Tsai und A. M. Piliponsky (2008). „The development of allergic inflammation". In: *Nature* 454.7203, S. 445–454. ISSN: 0028-0836.
- Gao, H. und P. A. Ward (2007). „STAT3 and suppressor of cytokine signaling 3: potential targets in lung inflammatory responses". In: *Expert opinion on therapeutic targets* 11.7, S. 869–880. ISSN: 1744-7631.
- Gao, X. M. (2016). „A network approach predicts NFKBIA and BIRC3 as pathogenic genes in childhood asthma". In: *Genetics and molecular research : GMR* 15.2. ISSN: 1676-5680.
- Garcia, G., V. Godot und M. Humbert (2005). „New chemokine targets for asthma therapy". In: *Current allergy and asthma reports* 5.2, S. 155–160. ISSN: 1529-7322.
- Gassler, N. u. a. (2007). „Regulation of enterocyte apoptosis by acyl-CoA synthetase 5 splicing". In: *Gastroenterology* 133.2, S. 587–598. ISSN: 0016-5085.
- Gavin, A.-C. u. a. (2002). „Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes". In: *Nature* 415.6868, S. 141–147. ISSN: 0028-0836.
- Gehring, U. u. a. (2015). „Exposure to air pollution and development of asthma and rhinoconjunctivitis throughout childhood and adolescence: a population-based birth cohort study". In: *The Lancet. Respiratory medicine* 3.12, S. 933–942. ISSN: 2213-2600.

- Gelebart, P., M. Opas und M. Michalak (2005). „Calreticulin, a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding chaperone of the endoplasmic reticulum“. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 37.2, S. 260–266. ISSN: 1878-5875.
- Gent, J. F., J. M. Kezik, M. E. Hill, E. Tsai, D.-W. Li und B. P. Leaderer (2012). „Household mold and dust allergens: exposure, sensitization and childhood asthma morbidity“. In: *Environmental research* 118, S. 86–93. ISSN: 0013-9351.
- Gersting, S. W., A. S. Lotz-Havla und A. C. Muntau (2012). „Bioluminescence Resonance Energy Transfer: An Emerging Tool for the Detection of Protein–Protein Interaction in Living Cells“. In: *Functional Genomics*. Hrsg. von M. Kaufmann und C. Klinger. Bd. 815. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, S. 253–263. ISBN: 978-1-61779-423-0.
- Ghavami, S. u. a. (2010). „S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3“. In: *Cell research* 20.3, S. 314–331. ISSN: 1748-7838.
- Giot, L. u. a. (2003). „A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*“. In: *Science (New York, N.Y.)* 302.5651, S. 1727–1736. ISSN: 0036-8075.
- Gluzman, Y. (1981). „SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants“. In: *Cell* 23.1, S. 175–182. ISSN: 00928674.
- Godava, M., R. Vrtel und R. Vodicka (2013). „STAT6 - polymorphisms, haplotypes and epistasis in relation to atopy and asthma“. In: *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 157.2, S. 172–180. ISSN: 1213-8118.
- Gong, F., Q. Su, Y. H. Pan, X. Huang und W. H. Shen (2013). „The emerging role of interleukin-21 in allergic diseases (Review)“. In: *Biomedical reports* 1.6, S. 837–839. ISSN: 2049-9434.
- Gould, S. J., J. E. Kalish, J. C. Morrell, J. Bjorkman, A. J. Urquhart und D. I. Crane (1996). „Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTs1 receptor“. In: *The Journal of Cell Biology* 135.1, S. 85–95. ISSN: 0021-9525.
- Granel, R. u. a. (2013). „Examination of the relationship between variation at 17q21 and childhood wheeze phenotypes“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 131.3, S. 685–694. ISSN: 1097-6825.
- Gray, M. R., H. V. Colot, L. Guarente und M. Rosbash (1982). „Open reading frame cloning: identification, cloning, and expression of open reading frame DNA“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79.21, S. 6598–6602. ISSN: 1091-6490.
- Green, S. A., G. Cole, M. Jacinto, M. Innis und S. B. Liggett (1993). „A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor“. In: *The Journal of biological chemistry* 268.31, S. 23116–23121. ISSN: 0021-9258.
- Green, S. A., J. Turki, P. Bejarano, I. P. Hall und S. B. Liggett (1995). „Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells“. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 13.1, S. 25–33. ISSN: 1044-1549.

- Green, S. A., J. Turki, M. Innis und S. B. Liggett (1994). „Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties“. In: *Biochemistry* 33.32, S. 9414–9419. ISSN: 0006-2960.
- Gronemeyer, T. u. a. (2013). „The proteome of human liver peroxisomes: identification of five new peroxisomal constituents by a label-free quantitative proteomics survey“. In: *PLoS ONE* 8.2, e57395. ISSN: 1932-6203.
- Grotenboer, N. S., M. E. Ketelaar, G. H. Koppelman und M. C. Nawijn (2013). „Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 131.3, S. 856–865. ISSN: 1097-6825.
- Guilbert, T. W., D. T. Mauger und Lemanske, Robert F Jr (2014). „Childhood asthma-predictive phenotype“. In: *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 2.6, S. 664–670. ISSN: 2213-2201.
- Gupta, A. u. a. (2014). „Defective IL-10 expression and in vitro steroid-induced IL-17A in paediatric severe therapy-resistant asthma“. In: *Thorax* 69.6, S. 508–515. ISSN: 00406376.
- Guruharsha, K. G., R. A. Obar, J. Mintseris, K. Aishwarya, R. T. Krishnan, K. Vijayraghavan und S. Artavanis-Tsakonas (2012). „Drosophila protein interaction map (DPiM): a paradigm for metazoan protein complex interactions“. In: *Fly* 6.4, S. 246–253. ISSN: 1933-6942.
- Ha, S. G., X. N. Ge, N. S. Bahaie, B. N. Kang, A. Rao, S. P. Rao und P. Sriramaraio (2013). „ORMDL3 promotes eosinophil trafficking and activation via regulation of integrins and CD48“. In: *Nature communications* 4, S. 2479. ISSN: 2041-1723.
- Halapi, E. u. a. (2010). „A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma“. In: *European journal of human genetics : EJHG* 18.8, S. 902–908. ISSN: 1476-5438.
- Hall, I. P., J. D. Blakey, K. A. Al Balushi, A. Wheatley, I. Sayers, M. E. Pembrey, S. M. Ring, W. L. McArdle und D. P. Strachan (2006). „b2-adrenoceptor polymorphisms and asthma from childhood to middle age in the British 1958 birth cohort: a genetic association study“. In: *The Lancet* 368.9537, S. 771–779. ISSN: 01406736.
- Hall, I., A. Wheatley, P. Wilding und S. Liggett (1995). „Association of Glu 27 b2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects“. In: *The Lancet* 345.8959, S. 1213–1214. ISSN: 01406736.
- Hamdan, F. F., M. Audet, P. Garneau, J. Pelletier und M. Bouvier (2005). „High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay“. In: *Journal of biomolecular screening* 10.5, S. 463–475. ISSN: 1087-0571.
- Hamdan, F. F., Y. Percherancier, B. Breton und M. Bouvier (2006). „Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET)“. In: *Current protocols in neuroscience* Chapter 5, Unit 5.23.
- Hamzaoui, A., H. Maalmi, A. Berraïes, H. Abid, J. Ammar und K. Hamzaoui (2011). „Transcriptional characteristics of CD4 T cells in young asthmatic children: RORC and FOXP3 axis“. In: *Journal of inflammation research* 4, S. 139–146. ISSN: 1178-7031.

- Han, G., S. D. Gupta, K. Gable, S. Niranjana Kumari, P. Moitra, F. Eichler, R. H. Brown, J. M. Harmon und T. M. Dunn (2009). „Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.20, S. 8186–8191. ISSN: 0027-8424.
- Han, S., M. A. Lone, R. Schneider und A. Chang (2010). „Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.13, S. 5851–5856. ISSN: 0027-8424.
- Handoyo, S. und L. J. Rosenwasser (2009). „Asthma phenotypes“. In: *Current allergy and asthma reports* 9.6, S. 439–445. ISSN: 1529-7322.
- Hart, G. T., A. K. Ramani und E. M. Marcotte (2006). „How complete are current yeast and human protein-interaction networks“. In: *Genome biology* 7.11, S. 120. ISSN: 1465-6914.
- Hartmann, E. und S. Prehn (1994). „The N-terminal region of the alpha-subunit of the TRAP complex has a conserved cluster of negative charges“. In: *FEBS Letters* 349.3, S. 324–326. ISSN: 00145793.
- Harvey, B. C. und K. R. Lutchen (2013). „Factors determining airway caliber in asthma“. In: *Critical reviews in biomedical engineering* 41.6, S. 515–532. ISSN: 0278-940X.
- Hawkins, G. A., S. T. Weiss und E. R. Bleeker (2008). „Clinical consequences of ADRb2 polymorphisms“. In: *Pharmacogenomics* 9.3, S. 349–358. ISSN: 1462-2416.
- Hawkins, G. A. u. a. (2006). „Sequence, Haplotype, and Association Analysis of ADRb2 in a Multiethnic Asthma Case-Control Study“. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174.10, S. 1101–1109. ISSN: 1073-449X.
- Hay, J. C., D. S. Chao, C. S. Kuo und R. H. Scheller (1997). „Protein interactions regulating vesicle transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in mammalian cells“. In: *Cell* 89.1, S. 149–158. ISSN: 00928674.
- Hayes, D., M. A. Jhaveri, D. M. Mannino, H. Strawbridge und J. Temprano (2013). „The effect of mold sensitization and humidity upon allergic asthma“. In: *The clinical respiratory journal* 7.2, S. 135–144. ISSN: 1752-699X.
- Hebert, T. E., S. Moffett, J. P. Morello, T. P. Loisel, D. G. Bichet, C. Barret und M. Bouvier (1996). „A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation“. In: *The Journal of biological chemistry* 271.27, S. 16384–16392. ISSN: 0021-9258.
- Hetz, C., F. Martinon, D. Rodriguez und L. H. Glimcher (2011). „The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1a“. In: *Physiological reviews* 91.4, S. 1219–1243. ISSN: 1522-1210.
- Hewitt, D. J. (2008). „Interpretation of the "positive" methacholine challenge“. In: *American journal of industrial medicine* 51.10, S. 769–781. ISSN: 1097-0274.
- Hillebrand, M., S. W. Gersting, A. S. Lotz-Havla, A. Schäfer, H. Rosewich, O. Valerius, A. C. Muntau und J. Gärtner (2012). „Identification of a new fatty acid synthesis-transport machinery at the peroxisomal membrane“. In: *The Journal of biological chemistry* 287.1, S. 210–221. ISSN: 1083-351X.
- Hirota, N. und J. G. Martin (2013). „Mechanisms of airway remodeling“. In: *Chest* 144.3, S. 1026–1032. ISSN: 0012-3692.

- Hirota, T. u. a. (2008). „Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 121.3, S. 769–770. ISSN: 1097-6825.
- Hizawa, N. (2009). „Beta-2 adrenergic receptor genetic polymorphisms and asthma“. In: *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 34.6, S. 631–643. ISSN: 02694727.
- (2011). „Pharmacogenetics of b2-agonists“. In: *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 60.3, S. 239–246. ISSN: 1440-1592.
- Hizawa, N., E. Yamaguchi, E. Jinushi und Y. Kawakami (2000). „A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 161.3 Pt 1, S. 906–909. ISSN: 1535-4970.
- Hjelmqvist, L., M. Tuson, G. Marfany, E. Herrero, S. Balcells und R. González-Duarte (2002). „ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins“. In: *Genome biology* 3.6, RESEARCH0027. ISSN: 1465-6914.
- Holgate, S. T. (2007). „Epithelium dysfunction in asthma“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120.6, S. 1233–1244. ISSN: 00916749.
- (2008). „Pathogenesis of Asthma“. In: *Clinical & Experimental Allergy* 38.6, S. 872–897. ISSN: 0954-7894.
- (2011). „Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128.3, S. 495–505. ISSN: 00916749.
- Holloway, J. W., P. R. Dunbar, G. A. Riley, G. M. Sawyer, P. F. Fitzharris, N. Pearce, G. S. Le Gros und R. Beasley (2000). „Association of beta2-adrenergic receptor polymorphisms with severe asthma“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 30.8, S. 1097–1103. ISSN: 0954-7894.
- Holzinger, A., S. Kammerer und A. A. Roscher (1997). „Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237.1, S. 152–157. ISSN: 0006291X.
- Hopes, E., C. McDougall, G. Christie, J. Dewar, A. Wheatley, I. P. Hall und P. J. Helms (1998). „Association of glutamine 27 polymorphism of beta 2 adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study“. In: *British Medical Journal* 316.7132, S. 664.
- Hori, Y. u. a. (2015). „A Food and Drug Administration-approved asthma therapeutic agent impacts amyloid b in the brain in a transgenic model of Alzheimer disease“. In: *The Journal of biological chemistry* 290.4, S. 1966–1978. ISSN: 1083-351X.
- Hsu, K. J. und S. E. Turvey (2013). „Functional analysis of the impact of ORMDL3 expression on inflammation and activation of the unfolded protein response in human airway epithelial cells“. In: *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 9.1, S. 4. ISSN: 1710-1484.
- Huang, H. H., T. C. Brennan, M. M. Muir und R. S. Mason (2009). „Functional alpha1- and beta2-adrenergic receptors in human osteoblasts“. In: *Journal of cellular physiology* 220.1, S. 267–275. ISSN: 1097-4652.

- Humbert, M., G. Menz, S. Ying, C. J. Corrigan, D. S. Robinson, S. R. Durham und A. B. Kay (1999). „The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences“. In: *Immunology today* 20.11, S. 528–533. ISSN: 0167-5699.
- Hutchison, C. A. 3., S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke und M. Smith (1978). „Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence“. In: *The Journal of biological chemistry* 253.18, S. 6551–6560. ISSN: 1083-351X.
- Hwang, S., S.-W. Son, S. C. Kim, Y. J. Kim, H. Jeong und D. Lee (2008). „A protein interaction network associated with asthma“. In: *Journal of theoretical biology* 252.4, S. 722–731. ISSN: 1095-8541.
- Ideker, T. und R. Sharan (2008). „Protein networks in disease“. In: *Genome research* 18.4, S. 644–652. ISSN: 1549-5469.
- Ierodiakonou, D. u. a. (2016). „Ambient air pollution, lung function, and airway responsiveness in asthmatic children“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 137.2, S. 390–399. ISSN: 1097-6825.
- Ispolatov, I., A. Yuryev, I. Mazo und S. Maslov (2005). „Binding properties and evolution of homodimers in protein-protein interaction networks“. In: *Nucleic acids research* 33.11, S. 3629–3635. ISSN: 0305-1048.
- Israel, E. u. a. (2001). „Effect of polymorphism of the beta(2)-adrenergic receptor on response to regular use of albuterol in asthma“. In: *International archives of allergy and immunology* 124.1-3, S. 183–186. ISSN: 1423-0097.
- Israel, E. u. a. (2004). „Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial“. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 364.9444, S. 1505–1512. ISSN: 22132600.
- Jacobs, C. und I. Pirson (2003). „Pitfalls in the use of transfected overexpression systems to study membrane proteins function: the case of TSH receptor and PRA1“. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 209.1-2, S. 71–75. ISSN: 03037207.
- Jacquemin, B. u. a. (2015). „Ambient air pollution and adult asthma incidence in six European cohorts (ESCAPE)“. In: *Environmental health perspectives* 123.6, S. 613–621. ISSN: 0091-6765.
- James, A. L., L. J. Palmer, E. Kicic, P. S. Maxwell, S. E. Lagan, G. F. Ryan und A. W. Musk (2005). „Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 171.2, S. 109–114. ISSN: 1535-4970.
- James, J. R., M. I. Oliveira, A. M. Carmo, A. Iaboni und S. J. Davis (2006). „A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer“. In: *Nature Methods* 3.12, S. 1001–1006. ISSN: 1548-7091.
- Jensen, L. J. und P. Bork (2008). „Biochemistry. Not comparable, but complementary“. In: *Science (New York, N.Y.)* 322.5898, S. 56–57. ISSN: 1095-9203.
- Joe, P. A., A. Banerjee und R. F. Luduena (2009). „Roles of beta-tubulin residues Ala428 and Thr429 in microtubule formation in vivo“. In: *The Journal of biological chemistry* 284.7, S. 4283–4291. ISSN: 1083-351X.

- Johnson, M. (1990). „The pharmacology of salmeterol“. In: *Lung* 168 Suppl, S. 115–119. ISSN: 0341-2040.
- (2006). „Molecular mechanisms of b2-adrenergic receptor function, response, and regulation“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117.1, S. 18–24. ISSN: 00916749.
- Johnsson, N. (2014). „Analyzing protein–protein interactions in the post-interactomic era. Are we ready for the endgame“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 445.4, S. 739–745. ISSN: 0006291X.
- Jones, J. M., J. C. Morrell und S. J. Gould (2001). „Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins“. In: *The Journal of Cell Biology* 153.6, S. 1141–1150. ISSN: 0021-9525.
- Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, P. D. Collins, D. T. Walsh, R. Moqbel, N. F. Totty, O. Truong, J. J. Hsuan und T. J. Williams (1994). „Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation“. In: *The Journal of experimental medicine* 179.3, S. 881–887. ISSN: 0022-1007.
- Kabesch, M. (2014). „Epigenetics in asthma and allergy“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 14.1, S. 62–68. ISSN: 1528-4050.
- Kabesch, M., M. Schedel, D. Carr, B. Woitsch, C. Fritzsche, S. K. Weiland und E. von Mutius (2006). „IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 117.2, S. 269–274. ISSN: 1097-6825.
- Kaboord, B. und M. Perr (2008). „Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation“. In: *Methods in molecular biology* 424, S. 349–364.
- Kajimoto, K., Y. Minami und H. Harashima (2014). „Cytoprotective role of the fatty acid binding protein 4 against oxidative and endoplasmic reticulum stress in 3T3-L1 adipocytes“. In: *FEBS open bio* 4, S. 602–610. ISSN: 2211-5463.
- Kallsen, K., N. Zehethofer, A. Abdelsadik, B. Lindner, M. Kabesch, H. Heine und T. Roder (2015). „ORMDL deregulation increases stress responses and modulates repair pathways in *Drosophila* airways“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 136.4, S. 1105–1108. ISSN: 1097-6825.
- Karvonen, A. M., A. Hyvärinen, M. Korppi, U. Haverinen-Shaughnessy, H. Renz, P. I. Pfefferle, S. Remes, J. Genuneit und J. Pekkanen (2015). „Moisture damage and asthma: a birth cohort study“. In: *Pediatrics* 135.3, e598–606. ISSN: 1098-4275.
- Kashiwayama, Y. u. a. (2005). „Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1746.2, S. 116–128. ISSN: 0006-3002.
- Katzen, F. (2007). „Gateway((R)) recombinational cloning: a biological operating system“. In: *Expert opinion on drug discovery* 2.4, S. 571–589. ISSN: 1746-045X.
- Kauffmann, F. und F. Demenais (2012). „Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 130.6, S. 1229–40, 1229–40. ISSN: 1097-6825.
- Kavalar, M. S., M. Balantic, M. Silar, M. Kosnik, P. Korosec und M. Rijavec (2012). „Association of ORMDL3, STAT6 and TBXA2R gene polymorphisms with asthma“. In: *International journal of immunogenetics* 39.1, S. 20–25. ISSN: 1744-313X.



- Kerley, C. P., B. Elnazir, J. Faul und L. Cormican (2015). „Vitamin D as an adjunctive therapy in asthma. Part 2: A review of human studies“. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 32, S. 75–92. ISSN: 1522-9629.
- Keskin, O., A. Gursoy, B. Ma und R. Nussinov (2008). „Principles of protein-protein interactions: what are the preferred ways for proteins to interact“. In: *Chemical reviews* 108.4, S. 1225–1244. ISSN: 0009-2665.
- Khan, D. A. (2014). „Allergic rhinitis and asthma: epidemiology and common pathophysiology“. In: *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 35.5, S. 357–361. ISSN: 1539-6304.
- Kiefer, K., A. Carreras-Sureda, R. García-López, F. Rubio-Moscardó, J. Casas, G. Fabriàs und R. Vicente (2015). „Coordinated regulation of the orosomucoid-like gene family expression controls de novo ceramide synthesis in mammalian cells“. In: *The Journal of biological chemistry* 290.5, S. 2822–2830. ISSN: 1083-351X.
- Kim, H. Y., R. H. DeKruyff und D. T. Umetsu (2010). „The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity“. In: *Nature immunology* 11.7, S. 577–584. ISSN: 1529-2908.
- Kim, P. M., A. Sboner, Y. Xia und M. Gerstein (2008). „The role of disorder in interaction networks: a structural analysis“. In: *Molecular systems biology* 4, S. 179. ISSN: 1744-4292.
- Kimura, T., K. Hiraoka, N. Kasahara und C. R. Logg (2010). „Optimization of enzyme-substrate pairing for bioluminescence imaging of gene transfer using Renilla and Gaussia luciferases“. In: *The journal of gene medicine* 12.6, S. 528–537. ISSN: 1521-2254.
- Kirsch, F., C. Teuner, P. Menn und R. Leidl (2013). „Krankheitskosten für Asthma und COPD bei Erwachsenen in der Bundesrepublik Deutschland“. In: *Das Gesundheitswesen* 75.07, S. 413–423. ISSN: 0941-3790.
- Knight, J. M. u. a. (2015). „Long-Acting Beta Agonists Enhance Allergic Airway Disease“. In: *PLoS ONE* 10.11, e0142212. ISSN: 1932-6203.
- Kobilka, B. K., T. Frielle, H. G. Dohlman, M. A. Bolanowski, R. A. Dixon, P. Keller, M. G. Caron und R. J. Lefkowitz (1987a). „Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions“. In: *The Journal of biological chemistry* 262.15, S. 7321–7327. ISSN: 0021-9258.
- Kobilka, B. K. u. a. (1987b). „cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84.1, S. 46–50. ISSN: 1091-6490.
- König, A., R. Happle, D. Bornholdt, H. Engel und K. H. Grzeschik (2000). „Mutations in the NSDHL gene, encoding a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome“. In: *American journal of medical genetics* 90.4, S. 339–346. ISSN: 0148-7299.
- Kopel, L. S., W. Phipatanakul und J. M. Gaffin (2014). „Social disadvantage and asthma control in children“. In: *Paediatric respiratory reviews* 15.3, S. 256–62, 256–62. ISSN: 1526-0550.
- Koppelman, G. H. (2006). „Gene by environment interaction in asthma“. In: *Current allergy and asthma reports* 6.2, S. 103–111. ISSN: 1529-7322.

- Korppi, M., L. Kuikka, T. Reijonen, K. Remes, K. Juntunen-Backman und K. Launiala (1994). „Bronchial asthma and hyperreactivity after early childhood bronchiolitis or pneumonia. An 8-year follow-up study“. In: *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 148.10, S. 1079–1084. ISSN: 1072-4710.
- Kucukkal, T. G., M. Petukh, L. Li und E. Alexov (2015). „Structural and physico-chemical effects of disease and non-disease nsSNPs on proteins“. In: *Current Opinion in Structural Biology* 32, S. 18–24. ISSN: 0959440X.
- Kumar, V., F. S. Heinemann und J. Ozols (1998). „Interleukin-2 induces N-glycosylation in T-cells: characterization of human lymphocyte oligosaccharyltransferase“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 247.2, S. 524–529. ISSN: 0006291X.
- Lage, K. (2014). „Protein-protein interactions and genetic diseases: The interactome“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1842.10, S. 1971–1980. ISSN: 0006-3002.
- Lajoie, S., I. Lewkowich, N. S. Herman, A. Sproles, J. T. Pesce, T. A. Wynn, M. J. Grusby, Q. Hamid und M. Wills-Karp (2014). „IL-21 receptor signalling partially mediates Th2-mediated allergic airway responses“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44.7, S. 976–985. ISSN: 1365-2222.
- Lambrecht, B. N. und H. Hammad (2012). „The airway epithelium in asthma“. In: *Nature medicine* 18.5, S. 684–692. ISSN: 1078-8956.
- Lan, T.-H., S. Kuravi, N. A. Lambert und L. Lee (2011). „Internalization Dissociates  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors“. In: *PLoS ONE* 6.2, e17361. ISSN: 1932-6203.
- Lander, E. S. u. a. (2001). „Initial sequencing and analysis of the human genome“. In: *Nature* 409.6822, S. 860–921. ISSN: 0028-0836.
- Lang, S. u. a. (2012). „Different effects of Sec61a, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells“. In: *Journal of Cell Science* 125.Pt 8, S. 1958–1969. ISSN: 0021-9533.
- Largent, J., B. Nickerson, D. Cooper und R. J. Delfino (2012). „Paediatric asthma hospital utilization varies by demographic factors and area socio-economic status“. In: *Public health* 126.11, S. 928–936. ISSN: 1476-5616.
- Larsen, G. L. (2000). „Differences between adult and childhood asthma“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 106.3 Suppl, S153–7. ISSN: 1097-6825.
- Laußmann, D., M. Haftenberger, U. Langen und D. Eis (2012). „Einflussfaktoren für Asthma bronchiale bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland“. In: *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 55.3, S. 308–317. ISSN: 1436-9990.
- Lazarus, S. C. (2010). „Clinical practice. Emergency treatment of asthma“. In: *The New England journal of medicine* 363.8, S. 755–764. ISSN: 1533-4406.
- Lee, J.-U., J. D. Kim und C.-S. Park (2015). „Gene-Environment Interactions in Asthma: Genetic and Epigenetic Effects“. In: *Yonsei medical journal* 56.4, S. 877–886. ISSN: 0513-5796.
- Lemmens, I., S. Lievens und J. Tavernier (2010). „Strategies towards high-quality binary protein interactome maps“. In: *Journal of proteomics* 73.8, S. 1415–1420. ISSN: 1876-7737.
- Leonard, P. und S. Sur (2003). „Interleukin-12: potential role in asthma therapy“. In: *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 17.1, S. 1–7. ISSN: 1173-8804.

- Leuppi, J. D. (2014). „Bronchoprovocation tests in asthma: direct versus indirect challenges“. In: *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 20.1, S. 31–36. ISSN: 1070-5287.
- Levy, B. D. (2013). „Sphingolipids and susceptibility to asthma“. In: *The New England journal of medicine* 369.10, S. 976–978. ISSN: 1533-4406.
- Lewinska, M., U. Zelenko, F. Merzel, S. Golic Grdadolnik, J. C. Murray und D. Rozman (2013). „Polymorphisms of CYP51A1 from cholesterol synthesis: associations with birth weight and maternal lipid levels and impact on CYP51 protein structure“. In: *PLoS ONE* 8.12, e82554. ISSN: 1932-6203.
- Li, L. und J. Kaplan (1996). „Characterization of yeast methyl sterol oxidase (ERG25) and identification of a human homologue“. In: *The Journal of biological chemistry* 271.28, S. 16927–16933. ISSN: 1083-351X.
- Li, L. u. a. (2014). „Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop“. In: *The Journal of biological chemistry* 289.47, S. 32628–32638. ISSN: 1083-351X.
- Liang, S.-Q., X.-L. Chen, J.-M. Deng, X. Wei, C. Gong, Z.-R. Chen und Z.-B. Wang (2014). „Beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies“. In: *PLoS ONE* 9.8, e104488. ISSN: 1932-6203.
- Liao, W., J.-X. Lin und W. J. Leonard (2011). „IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation“. In: *Current opinion in immunology* 23.5, S. 598–604. ISSN: 1879-0372.
- Lima, J., D. THOMASON, M. MOHAMED, L. EBERLE, T. SELF und J. JOHNSON (1999). „Impact of genetic polymorphisms of the  $\beta$ -adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics“. In: *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 65.5, S. 519–525. ISSN: 00099236.
- Lin, R., H. Peng, L. P. Nguyen, N. B. Dudekula, F. Shardonofsky, B. J. Knoll, S. Parra und R. A. Bond (2008). „Changes in beta 2-adrenoceptor and other signaling proteins produced by chronic administration of 'beta-blockers' in a murine asthma model“. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 21.1, S. 115–124. ISSN: 1522-9629.
- Lindén, A. und B. Dahlén (2014). „Interleukin-17 cytokine signalling in patients with asthma“. In: *The European respiratory journal* 44.5, S. 1319–1331. ISSN: 1399-3003.
- Lipworth, B. J. und P. A. Williamson (2009). „Think the impossible: B-blockers for treating asthma“. In: *Clinical Science* 118.2, S. 115–120.
- Lipworth, B. J. (1999). „Effects of Genetic Polymorphism on Ex Vivo and In Vivo Function of beta2-Adrenoceptors in Asthmatic Patients“. In: *CHEST Journal* 115.2, S. 324. ISSN: 0012-3692.
- Litonjua, A. A. (2004). „2-Adrenergic Receptor Polymorphisms and Haplotypes Are Associated With Airways Hyperresponsiveness Among Nonsmoking Men“. In: *Chest* 126.1, S. 66–74. ISSN: 0012-3692.
- Liu, Y. und S. Liu (2012). „Protein-protein interaction network analysis of children atopic asthma“. In: *European review for medical and pharmacological sciences* 16.7, S. 867–872. ISSN: 1128-3602.
- Lluis, A. und B. Schaub (2012). „Lesson from the farm environment“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 12.2, S. 158–163. ISSN: 1528-4050.

- Lluis, A., M. Schedel, J. Liu, S. Illi, M. Depner, E. von Mutius, M. Kabesch und B. Schaub (2011). „Asthma-associated polymorphisms in 17q21 influence cord blood ORMDL3 and GSDMA gene expression and IL-17 secretion“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 127.6, 1587–94.e6. ISSN: 1097-6825.
- Lötvall, J. u. a. (2011). „Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 127.2, S. 355–360. ISSN: 1097-6825.
- Loubaki, L., I. Hadj-Salem, R. Fakhfakh, E. Jacques, S. Plante, M. Boisvert, F. Aoudjit und J. Chakir (2013). „Co-culture of human bronchial fibroblasts and CD4+ T cells increases Th17 cytokine signature“. In: *PLoS ONE* 8.12, e81983. ISSN: 1932-6203.
- Lourenco, E. V. und M.-C. Roque-Barreira (2010). „Immunoenzymatic quantitative analysis of antigens expressed on the cell surface (cell-ELISA)“. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 588, S. 301–309. ISSN: 1064-3745.
- Lowe, S. L., F. Peter, V. N. Subramaniam, S. H. Wong und W. Hong (1997). „A SNARE involved in protein transport through the Golgi apparatus“. In: *Nature* 389.6653, S. 881–884. ISSN: 0028-0836.
- Loza, M. J., S. Foster, S. P. Peters und R. B. Penn (2008). „Interactive effects of steroids and beta-agonists on accumulation of type 2 T cells“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 121.3, 750.e1–5.e3. ISSN: 1097-6825.
- Loza, M. J., S. P. Peters, S. Foster, I. U. Khan und R. B. Penn (2007). „beta-Agonist enhances type 2 T-cell survival and accumulation“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 119.1, S. 235–244. ISSN: 1097-6825.
- Lundback, B., H. Backman, J. Lotvall und E. Ronmark (2016). „Is asthma prevalence still increasing“. In: *Expert review of respiratory medicine* 10.1, S. 39–51. ISSN: 1747-6356.
- Luo, J., Y.-H. Liu, W. Luo, Z. Luo und C.-T. Liu (2017). „beta2-adrenoreceptor Inverse Agonist Down-regulates Muscarine Cholinergic Subtype-3 Receptor and Its Downstream Signal Pathways in Airway Smooth Muscle Cells in vitro“. In: *Scientific reports* 7, S. 39905. ISSN: 2045-2322.
- Lykouras, D., F. Sampsonas, A. Kaparianos, K. Karkoulas und K. Spiropoulos (2008). „Role and pharmacogenomics of TNF-alpha in asthma“. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 8.9, S. 934–942. ISSN: 1389-5575.
- Makrythanasis, P. und S. E. Antonarakis (2013). „Pathogenic variants in non-protein-coding sequences“. In: *Clinical genetics* 84.5, S. 422–428. ISSN: 1399-0004.
- Malek, T. R. und I. Castro (2010). „Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity“. In: *Immunity* 33.2, S. 153–165. ISSN: 1097-4180.
- Malmström, K., A. S. Pelkonen und M. J. Mäkelä (2013). „Remodeling, inflammation and airway responsiveness in early childhood asthma“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 13.2, S. 203–210. ISSN: 1528-4050.
- Maltsev, N., A. Rzhetsky und T. C. Gilliam (2013). *Systems Analysis of Human Multigene Disorders*. Springer New York. ISBN: 9781461487784.
- Mantzouranis, E., E. Papadopoulou und E. Michailidi (2014). „Childhood asthma“. In: *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 20.1, S. 8–16. ISSN: 1070-5287.

- Martinet, W., D. M. Schrijvers und M. M. Kockx (2003). „Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells“. In: *Biotechnology letters* 25.13, S. 1025–1029. ISSN: 0141-5492.
- Martinez, F. D., P. E. Graves, M. Baldini, S. Solomon und R. Erickson (1997). „Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing“. In: *The Journal of clinical investigation* 100.12, S. 3184–3188. ISSN: 0021-9738.
- Martinez, F. D. und D. Vercelli (2013). „Asthma“. In: *The Lancet* 382.9901, S. 1360–1372. ISSN: 01406736.
- Masoli, M., D. Fabian, S. Holt und R. Beasley (2004). „The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report“. In: *Allergy* 59.5, S. 469–478. ISSN: 01054538.
- Mat, Z., B. Grensemann, Y. Yakin, J. Knobloch und A. Koch (2012). „Effect of lipoteichoic acid on IL-2 and IL-5 release from T lymphocytes in asthma and COPD“. In: *International Immunopharmacology* 13.3, S. 284–291. ISSN: 15675769.
- McGraw, D. W., K. F. Almoosa, R. J. Paul, B. K. Kobilka und S. B. Liggett (2003). „Antitthetic regulation by beta-adrenergic receptors of Gq receptor signaling via phospholipase C underlies the airway beta-agonist paradox“. In: *The Journal of clinical investigation* 112.4, S. 619–626. ISSN: 0021-9738.
- McGraw, D. W., K. A. Mhlbachler, M. R. Schwarb, F. F. Rahman, K. M. Small, K. F. Almoosa und S. B. Liggett (2006). „Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex“. In: *The Journal of clinical investigation* 116.5, S. 1400–1409. ISSN: 0021-9738.
- Meissner, P. S., W. P. Sisk und M. L. Berman (1987). „Bacteriophage lambda cloning system for the construction of directional cDNA libraries“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84.12, S. 4171–4175. ISSN: 1091-6490.
- Menche, J., A. Sharma, M. Kitsak, S. D. Ghiassian, M. Vidal, J. Loscalzo und A.-L. Barabasi (2015). „Disease networks. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome“. In: *Science* 347.6224, S. 1257601. ISSN: 0036-8075.
- Mercier, J.-F. (2002). „Quantitative Assessment of beta 1- and beta 2-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.47, S. 44925–44931. ISSN: 0021-9258.
- Mewes, H. W. u. a. (2011). „MIPS: curated databases and comprehensive secondary data resources in 2010“. In: *Nucleic acids research* 39.Database issue, S. D220–4. ISSN: 0305-1048.
- Meyers, D. A., E. R. Bleecker, J. W. Holloway und S. T. Holgate (2014). „Asthma genetics and personalised medicine“. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 2.5, S. 405–415. ISSN: 22132600.
- Michalak, M., Robert Parker, J. M und M. Opas (2002). „Ca<sup>2+</sup> signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum“. In: *Cell calcium* 32.5-6, S. 269–278. ISSN: 0143-4160.

- Migita, O., E. Noguchi, Z. Jian, M. Shibasaki, T. Migita, K. Ichikawa, A. Matsui und T. Arinami (2004). „ADRB2 polymorphisms and asthma susceptibility: transmission disequilibrium test and meta-analysis“. In: *International archives of allergy and immunology* 134.2, S. 150–157. ISSN: 1423-0097.
- Miller, M. u. a. (2012). „ORMDL3 is an inducible lung epithelial gene regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.41, S. 16648–16653. ISSN: 1091-6490.
- Milligan, K. L., E. Matsui und H. Sharma (2016). „Asthma in Urban Children: Epidemiology, Environmental Risk Factors, and the Public Health Domain“. In: *Current allergy and asthma reports* 16.4, S. 33. ISSN: 1529-7322.
- Mirzazadee, M., B. N. Araabi und M. Sadeghi (2010). „Features analysis for identification of date and party hubs in protein interaction network of *Saccharomyces Cerevisiae*“. In: *BMC systems biology* 4, S. 172. ISSN: 1752-0509.
- Mitsuyasu, H. u. a. (1998). „Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma“. In: *Nature genetics* 19.2, S. 119–120. ISSN: 1546-1718.
- Moffatt, M. F., C. Schou, J. A. Faux, G. R. Abecasis, A. James, A. W. Musk und W. O. Cookson (2001). „Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample“. In: *European journal of human genetics : EJHG* 9.5, S. 341–346. ISSN: 1476-5438.
- Moffatt, M. F. u. a. (2007). „Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma“. In: *Nature* 448.7152, S. 470–473. ISSN: 0028-0836.
- Moreira, A. P. und C. M. Hogaboam (2011). „Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution“. In: *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31.6, S. 485–491. ISSN: 1557-7465.
- Al-Muhsen, S., J. R. Johnson und Q. Hamid (2011). „Remodeling in asthma“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 128.3, S. 451–62, 451–62. ISSN: 1097-6825.
- Müller, W., H. Weber, F. Meyer und C. Weissmann (1978). „Site-directed mutagenesis in DNA: Generation of point mutations in cloned b globin complementary DNA at the positions corresponding to amino acids 121 to 123“. In: *Journal of Molecular Biology* 124.2, S. 343–358. ISSN: 00222836.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich (1986). „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction“. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1, S. 263–273. ISSN: 0091-7451.
- Muntau, A. C. (2003). „The interaction between human PEX3 and PEX19 characterized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis“. In: *European Journal of Cell Biology* 82.7, S. 333–342. ISSN: 01719335.
- Muntau, A. C., P. U. Mayerhofer, B. C. Paton, S. Kammerer und A. A. Roscher (2000). „Defective peroxisome membrane synthesis due to mutations in human PEX3 causes Zellweger syndrome, complementation group G“. In: *American journal of human genetics* 67.4, S. 967–975. ISSN: 0002-9297.
- Mutius, E. von (2009). „Gene-environment interactions in asthma“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 123.1, S. 3–11, 3–11. ISSN: 1097-6825.

- Myers, R. A. u. a. (2014). „Genome-wide interaction studies reveal sex-specific asthma risk alleles“. In: *Human Molecular Genetics* 23.19, S. 5251–5259. ISSN: 1460-2083.
- Nagai, T., K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba und A. Miyawaki (2002). „A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications“. In: *Nature biotechnology* 20.1, S. 87–90. ISSN: 1087-0156.
- Nakajima, H. und K. Takatsu (2007). „Role of cytokines in allergic airway inflammation“. In: *International archives of allergy and immunology* 142.4, S. 265–273. ISSN: 1423-0097.
- Nelson, H. S., S. T. Weiss, E. R. Bleeker, S. W. Yancey und P. M. Dorinsky (2006). „The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol“. In: *Chest* 129.1, S. 15–26. ISSN: 0012-3692.
- Newcomb, D. C. und R. S. Peebles (2013). „Th17-mediated inflammation in asthma“. In: *Current opinion in immunology* 25.6, S. 755–760. ISSN: 1879-0372.
- Ng, S. B. u. a. (2010). „Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder“. In: *Nature genetics* 42.1, S. 30–35. ISSN: 1546-1718.
- Nguyen, L. P., R. Lin, S. Parra, O. Omoluabi, N. A. Hanania, M. J. Tuvim, B. J. Knoll, B. F. Dickey und R. A. Bond (2009). „Beta2-adrenoceptor signaling is required for the development of an asthma phenotype in a murine model“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.7, S. 2435–2440. ISSN: 1091-6490.
- Nguyen, L. P. u. a. (2008). „Chronic exposure to beta-blockers attenuates inflammation and mucin content in a murine asthma model“. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38.3, S. 256–262. ISSN: 1044-1549.
- Novarino, G. u. a. (2014). „Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders“. In: *Science* 343.6170, S. 506–511. ISSN: 0036-8075.
- Ober, C. und T.-C. Yao (2011). „The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective“. In: *Immunological Reviews* 242.1, S. 10–30. ISSN: 01052896.
- Ohno, Y., A. Kashio, R. Ogata, A. Ishitomi, Y. Yamazaki und A. Kihara (2012). „Analysis of substrate specificity of human DHHC protein acyltransferases using a yeast expression system“. In: *Molecular Biology of the Cell* 23.23, S. 4543–4551. ISSN: 1059-1524.
- Okada, S. u. a. (2015). „IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations“. In: *Science (New York, N.Y.)* 349.6248, S. 606–613. ISSN: 0036-8075.
- Oldfield, C. J. und A. K. Dunker (2014). „Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions“. In: *Annual review of biochemistry* 83, S. 553–584. ISSN: 1545-4509.
- Oner, S. S., E. M. Maher, B. Breton, M. Bouvier und J. B. Blumer (2010). „Receptor-regulated interaction of activator of G-protein signaling-4 and Galphai“. In: *The Journal of biological chemistry* 285.27, S. 20588–20594. ISSN: 1083-351X.
- Ortega, V. E. und M. E. Wechsler (2013). „Asthma pharmacogenetics: responding to the call for a personalized approach“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 13.4, S. 399–409. ISSN: 1528-4050.

- Ortega, V. E. u. a. (2014). „Effect of rare variants in ADRB2 on risk of severe exacerbations and symptom control during longacting b agonist treatment in a multiethnic asthma population: a genetic study“. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 2.3, S. 204–213. ISSN: 22132600.
- Ortega, V. E. und S. P. Peters (2010). „Beta-2 adrenergic agonists: focus on safety and benefits versus risks“. In: *Current Opinion in Pharmacology* 10.3, S. 246–253. ISSN: 14714892.
- Paaso, E. M. S., M. S. Jaakkola, A. K. Rantala, T. T. Hugg und J. J. K. Jaakkola (2014). „Allergic diseases and asthma in the family predict the persistence and onset-age of asthma: a prospective cohort study“. In: *Respiratory research* 15, S. 152. ISSN: 1465-9921.
- Padrón-Morales, J., C. Sanz, I. Dávila, F. Muñoz-Bellido, F. Lorente und M. Isidoro-García (2013). „Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma“. In: *Journal of investigational allergology & clinical immunology* 23.7, S. 487–494. ISSN: 1018-9068.
- Panebra, A., W. C. Wang, M. M. Malone, Pitter, Demar R. G., S. T. Weiss, G. A. Hawkins, S. B. Liggett und A. Schwartz (2010). „Common ADRB2 Haplotypes Derived from 26 Polymorphic Sites Direct b2-Adrenergic Receptor Expression and Regulation Phenotypes“. In: *PLoS ONE* 5.7, e11819. ISSN: 1932-6203.
- Papadopoulos, N. G. u. a. (2012). „International consensus on (ICON) pediatric asthma“. In: *Allergy* 67.8, S. 976–997. ISSN: 01054538.
- Paramesh, H. (2008). „Asthma in children: seasonal variations“. In: *International Journal of Environment and Health* 2.3-4, S. 410–416. ISSN: 1743-4955.
- Park, H.-W., K. G. Tantisira und S. T. Weiss (2015). „Pharmacogenomics in asthma therapy: where are we and where do we go?“ In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 55, S. 129–147. ISSN: 0362-1642.
- Pascual, R. M. und S. P. Peters (2009). „The irreversible component of persistent asthma“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 124.5, S. 883–90, 883–90. ISSN: 1097-6825.
- Patadia, M. O., L. L. Murrill und J. Corey (2014). „Asthma: symptoms and presentation“. In: *Otolaryngologic clinics of North America* 47.1, S. 23–32. ISSN: 0030-6665.
- Pearce, N., N. Ait-Khaled, R. Beasley, J. Mallol, U. Keil, E. Mitchell und C. Robertson (2007). „Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)“. In: *Thorax* 62.9, S. 758–766. ISSN: 00406376.
- Pease, J. E. und R. Horuk (2014). „Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4“. In: *Expert opinion on drug discovery* 9.5, S. 467–483. ISSN: 1746-045X.
- Pelham, H. R. (1996). „The dynamic organisation of the secretory pathway“. In: *Cell structure and function* 21.5, S. 413–419. ISSN: 0386-7196.
- Perkins, J. R., I. Diboun, B. H. Dessailly, J. G. Lees und C. Orengo (2010). „Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties“. In: *Structure* 18.10, S. 1233–1243.



- Peters, S. P. (2014). „Asthma phenotypes: nonallergic (intrinsic) asthma“. In: *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 2.6, S. 650–652. ISSN: 2213-2201.
- Pfleger, K. D. G. und K. A. Eidne (2005). „Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells“. In: *The Biochemical journal* 385.Pt 3, S. 625–637. ISSN: 1470-8728.
- (2006a). „Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)“. In: *Nature Methods* 3.3, S. 165–174. ISSN: 1548-7091.
- Pfleger, K. D. G., R. M. Seeber und K. A. Eidne (2006b). „Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions“. In: *Nature Protocols* 1.1, S. 337–345. ISSN: 1754-2189.
- Piippo-Savolainen, E. und M. Korppi (2008). „Wheezy babies–wheezy adults: Rollro Review on long-term outcome until adulthood after early childhood wheezing“. In: *Acta paediatrica* 97.1, S. 5–11.
- Pijnenburg, M. W. und S. Szeffler (2015). „Personalized medicine in children with asthma“. In: *Paediatric respiratory reviews* 16.2, S. 101–107. ISSN: 1526-0550.
- Pinto, L. A., R. T. Stein und M. Kabesch (2008). „Impact of genetics in childhood asthma“. In: *Jornal de Pediatria*. ISSN: 0021-7557.
- Ponath, P. D. u. a. (1996). „Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils“. In: *The Journal of clinical investigation* 97.3, S. 604–612. ISSN: 0021-9738.
- Portelli, M. A., E. Hodge und I. Sayers (2015). „Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 45.1, S. 21–31. ISSN: 1365-2222.
- Portelli, M. A. und I. Sayers (2012). „Genetic basis for personalized medicine in asthma“. In: *Expert review of respiratory medicine* 6.2, S. 223–236. ISSN: 1747-6356.
- Postma, D. S., E. R. Bleeker, P. J. Amelung, K. J. Holroyd, J. Xu, C. I. Panhuysen, D. A. Meyers und R. C. Levitt (1995). „Genetic susceptibility to asthma–bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy“. In: *The New England journal of medicine* 333.14, S. 894–900. ISSN: 1533-4406.
- Postma, D. S., D. A. Meyers, H. Jongepier, T. D. Howard, G. H. Koppelman und E. R. Bleeker (2005). „Genomewide screen for pulmonary function in 200 families ascertained for asthma“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 172.4, S. 446–452. ISSN: 1535-4970.
- Pruitt, K. D. u. a. (2014). „RefSeq: an update on mammalian reference sequences“. In: *Nucleic acids research* 42.Database issue, S. D756–63. ISSN: 0305-1048.
- Qian, X., Y. Gao, X. Ye und M. Lu (2014). „Association of STAT6 variants with asthma risk: a systematic review and meta-analysis“. In: *Human immunology* 75.8, S. 847–853. ISSN: 1879-1166.

- Radhakrishnan, D. K., S. D. Dell, A. Guttmann, S. Z. Shariff, K. Liu und T. To (2014). „Trends in the age of diagnosis of childhood asthma“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 134.5, 1057–62.e5. ISSN: 1097-6825.
- Raedler, D. u. a. (2014). „Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. ISSN: 00916749.
- Ramsay, C. E., C. M. Hayden, K. J. Tiller, P. R. Burton, J. Goldblatt und P. N. Lesouef (1999). „Polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene are associated with decreased airway responsiveness“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29.9, S. 1195–1203. ISSN: 0954-7894.
- Rava, M., L. A. M. Smit und R. Nadif (2015). „Gene-environment interactions in the study of asthma in the postgenomewide association studies era“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 15.1, S. 70–78. ISSN: 1528-4050.
- Reihnsaus, E., M. Innis, N. MacIntyre und S. B. Liggett (1993). „Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects“. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 8.3, S. 334–339. ISSN: 1044-1549.
- Reiss, T. F., L. C. Altman, P. Chervinsky, A. Bewtra, W. E. Stricker, G. P. Noonan, S. Kundu und J. Zhang (1996). „Effects of montelukast (MK-0476), a new potent cysteinyl leukotriene (LTD<sub>4</sub>) receptor antagonist, in patients with chronic asthma“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 98.3, S. 528–534. ISSN: 1097-6825.
- Reiterer, V., B. Nyfeler und H.-P. Hauri (2010). „Role of the lectin VIP36 in post-ER quality control of human alpha1-antitrypsin“. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11.8, S. 1044–1055. ISSN: 1600-0854.
- Renauld, J. C. (2001). „New insights into the role of cytokines in asthma“. In: *Journal of clinical pathology* 54.8, S. 577–589. ISSN: 0021-9746.
- Renkonen, J., S. Joenvaara, V. Parviainen, P. Mattila und R. Renkonen (2010). „Network analysis of single nucleotide polymorphisms in asthma“. In: *Journal of asthma and allergy* 3, S. 177–186. ISSN: 1178-6965.
- Rennie, D. C., C. P. Karunanayake, Y. Chen, J. A. Lawson, L. Hagel, A. Senthilselvan, P. Pahwa und J. A. Dosman (2016). „Early farm residency and prevalence of asthma and hay fever in adults“. In: *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 53.1, S. 2–10. ISSN: 1532-4303.
- Rhoden, K. J., L. A. Meldrum und P. J. Barnes (1988). „Inhibition of cholinergic neurotransmission in human airways by beta 2-adrenoceptors“. In: *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 65.2, S. 700–705. ISSN: 8750-7587.
- Rigoli, L., S. Briuglia, S. Caimmi, V. Ferrau, R. Gallizzi, S. Leonardi, M. La Rosa und C. Salpietro (2011). „Gene-environment interaction in childhood asthma“. In: *International journal of immunopathology and pharmacology* 24.4 Suppl, S. 41–47. ISSN: 0394-6320.
- Roberts, R. J. (2005). „How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.17, S. 5905–5908. ISSN: 1091-6490.
- Roelants, F. M., D. K. Breslow, A. Muir, J. S. Weissman und J. Thorner (2011). „Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingo-

- lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.48, S. 19222–19227. ISSN: 1091-6490.
- Rolland, P. u. a. (2014). „A proteome-scale map of the human interactome network“. In: *Cell* 159.5, S. 1212–1226. ISSN: 00928674.
- Rosenwasser, L. J., D. J. Klemm, J. K. Dresback, H. Inamura, J. J. Mascali, M. Klinnert und L. Borish (1995). „Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 25 Suppl 2, S. 74–8, 74–8. ISSN: 1365-2222.
- Roth, S. u. a. (2014). „Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 $\beta$  production“. In: *Nature immunology* 15.6, S. 538–545. ISSN: 1529-2908.
- Rual, J.-F. u. a. (2005). „Towards a proteome-scale map of the human protein–protein interaction network“. In: *Nature* 437.7062, S. 1173–1178. ISSN: 0028-0836.
- Rusanen, M., T. Ngandu, T. Laatikainen, J. Tuomilehto, H. Soininen und M. Kivipelto (2013). „Chronic obstructive pulmonary disease and asthma and the risk of mild cognitive impairment and dementia: a population based CAIDE study“. In: *Current Alzheimer research* 10.5, S. 549–555. ISSN: 1875-5828.
- Salahpour, A. (2004). „Homodimerization of the 2-Adrenergic Receptor as a Prerequisite for Cell Surface Targeting“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.32, S. 33390–33397. ISSN: 0021-9258.
- Salpeter, S. R., N. S. Buckley, T. M. Ormiston und E. E. Salpeter (2006). „Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths“. In: *Annals of internal medicine* 144.12, S. 904–912. ISSN: 1539-3704.
- Sandberg, S., J. Y. Paton, S. Ahola, D. C. McCann, D. McGuinness, C. R. Hillary und H. Oja (2000). „The role of acute and chronic stress in asthma attacks in children“. In: *The Lancet* 356.9234, S. 982–987. ISSN: 01406736.
- Santillan, A. A., C. A. Camargo, A. Ramirez-Rivera, I. Delgado-Enciso, A. Rojas-Martinez, F. Cantu-Diaz und H. A. Barrera-Saldaña (2003). „Association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 112.6, S. 1095–1100. ISSN: 1097-6825.
- Sartania, N., S. Appelbe, J. D. Padiani und G. Milligan (2007). „Agonist occupancy of a single monomeric element is sufficient to cause internalization of the dimeric b2-adrenoceptor“. In: *Cellular Signalling* 19.9, S. 1928–1938. ISSN: 08986568.
- Sayers, I., C. Swan und I. P. Hall (2006). „The effect of beta2-adrenoceptor agonists on phospholipase C (beta1) signalling in human airway smooth muscle cells“. In: *European Journal of Pharmacology* 531.1-3, S. 9–12. ISSN: 00142999.
- Scadding, G. K. (2007). „Further marches: allergic and non-allergic“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 37.4, S. 485–487. ISSN: 1365-2222.
- Schatz, U. A. (2014). *Aufbau eines Systems zur Untersuchung peroxisomaler Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle mittels Biolumineszenz Resonanzenergietransfer*. München: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schedel, M. u. a. (2015). „Polymorphisms related to ORMDL3 are associated with asthma susceptibility, alterations in transcriptional regulation of ORMDL3, and changes in

- TH2 cytokine levels“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 136.4, 893–903.e14. ISSN: 1097-6825.
- Schlesinger, M. J. (1990). „Heat shock proteins“. In: *The Journal of biological chemistry* 265.21, S. 12111–12114. ISSN: 1083-351X.
- Schmidpeter, P. A. M. und F. X. Schmid (2015). „Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding and protein function“. In: *Journal of Molecular Biology* 427.7, S. 1609–1631. ISSN: 00222836.
- Schmitz, R., K. Atzpodien und M. Schlaud (2012). „Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents“. In: *Pediatric Allergy and Immunology* 23.8, S. 716–723. ISSN: 09056157.
- Schröder, M. und R. J. Kaufman (2005). „The mammalian unfolded protein response“. In: *Annual review of biochemistry* 74, S. 739–789. ISSN: 1545-4509.
- Sears, M. R. u. a. (2003). „A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood“. In: *The New England journal of medicine* 349.15, S. 1414–1422. ISSN: 1533-4406.
- Shaker, M. (2014). „New insights into the allergic march“. In: *Current opinion in pediatrics* 26.4, S. 516–520. ISSN: 1040-8703.
- Shapiro, S. D. und C. A. Owen (2002). „ADAM-33 surfaces as an asthma gene“. In: *The New England journal of medicine* 347.12, S. 936–938. ISSN: 1533-4406.
- Sharma, R., S. M. Fu und S.-T. Ju (2011). „IL-2: a two-faced master regulator of autoimmunity“. In: *Journal of autoimmunity* 36.2, S. 91–97. ISSN: 1095-9157.
- Shimizu, K. und H. Toh (2009). „Interaction between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network“. In: *Journal of Molecular Biology* 392.5, S. 1253–1265. ISSN: 00222836.
- Silverpil, E. und A. Lindén (2012). „IL-17 in human asthma“. In: *Expert review of respiratory medicine* 6.2, S. 173–186. ISSN: 1747-6356.
- Singh, G. P., M. Ganapathi und D. Dash (2007). „Role of intrinsic disorder in transient interactions of hub proteins“. In: *Proteins* 66.4, S. 761–765. ISSN: 1097-0134.
- Siroux, V. und J. Garcia-Aymerich (2011). „The investigation of asthma phenotypes“. In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 11.5, S. 393–399. ISSN: 1528-4050.
- Sleiman, P. M. A. u. a. (2008). „ORMDL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 122.6, S. 1225–1227. ISSN: 1097-6825.
- Smith, L. u. a. (2003). „Candidate testis-determining gene, Maestro (Mro), encodes a novel HEAT repeat protein“. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 227.4, S. 600–607. ISSN: 1058-8388.
- Solis-Cohen, S. (1900). „THE USE OF ADRENAL SUBSTANCE IN THE TREATMENT OF ASTHMA“. In: *JAMA: The Journal of the American Medical Association* XXXIV.19, S. 1164. ISSN: 0098-7484.
- Sorkness, C. A. (1997). „The use of 5-lipoxygenase inhibitors and leukotriene receptor antagonists in the treatment of chronic asthma“. In: *Pharmacotherapy* 17.1 Pt 2, 50S–54S. ISSN: 0277-0008.

- Spitzer, W. O. u. a. (1992). „The use of beta-agonists and the risk of death and near death from asthma“. In: *The New England journal of medicine* 326.8, S. 501–506. ISSN: 1533-4406.
- Sporik, R., S. T. Holgate, T. A. Platts-Mills und J. J. Cogswell (1990). „Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study“. In: *The New England journal of medicine* 323.8, S. 502–507. ISSN: 1533-4406.
- Stark, C., B.-J. Breitkreutz, T. Reguly, L. Boucher, A. Breitkreutz und M. Tyers (2006). „BioGRID: a general repository for interaction datasets“. In: *Nucleic acids research* 34.Database issue, S. D535–9. ISSN: 0305-1048.
- Stelzl, U. u. a. (2005). „A Human Protein-Protein Interaction Network: A Resource for Annotating the Proteome“. In: *Cell* 122.6, S. 957–968. ISSN: 00928674.
- Stern, D. A., W. J. Morgan, M. Halonen, A. L. Wright und F. D. Martinez (2008). „Wheezing and bronchial hyper-responsiveness in early childhood as predictors of newly diagnosed asthma in early adulthood: a longitudinal birth-cohort study“. In: *The Lancet* 372.9643, S. 1058–1064. ISSN: 01406736.
- Stevenson, L. A., P. J. Gergen, D. R. Hoover, D. Rosenstreich, D. M. Mannino und T. D. Matte (2001). „Sociodemographic correlates of indoor allergen sensitivity among United States children“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 108.5, S. 747–752. ISSN: 1097-6825.
- Stone, K. D., C. Prussin und D. D. Metcalfe (2010). „IgE, mast cells, basophils, and eosinophils“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125.2 Suppl 2, S73–80. ISSN: 1097-6825.
- Strunk, R. C., S. T. Weiss, K. P. Yates, J. Tonascia, R. S. Zeiger und S. J. Szefer (2006). „Mild to moderate asthma affects lung growth in children and adolescents“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 118.5, S. 1040–1047. ISSN: 1097-6825.
- Stuart, L. M. u. a. (2007). „A systems biology analysis of the Drosophila phagosome“. In: *Nature* 445.7123, S. 95–101. ISSN: 0028-0836.
- Stumpf, M. P. H., T. Thorne, E. de Silva, R. Stewart, H. J. An, M. Lappe und C. Wiuf (2008). „Estimating the size of the human interactome“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.19, S. 6959–6964. ISSN: 1091-6490.
- Su, M.-W., K.-Y. Tung, P.-H. Liang, C.-H. Tsai, N.-W. Kuo und Y. L. Lee (2012). „Gene-gene and gene-environmental interactions of childhood asthma: a multifactor dimension reduction approach“. In: *PLoS ONE* 7.2, e30694. ISSN: 1932-6203.
- Suissa, S. u. a. (1994). „A cohort analysis of excess mortality in asthma and the use of inhaled beta-agonists“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 149.3 Pt 1, S. 604–610. ISSN: 1535-4970.
- Summerhill, E., S. A. Leavitt, H. Gidley, R. Parry, J. Solway und C. Ober (2000). „beta(2)-adrenergic receptor Arg16/Arg16 genotype is associated with reduced lung function, but not with asthma, in the Hutterites“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 162.2 Pt 1, S. 599–602. ISSN: 1073-449X.
- Swift, H. F. (1921). „Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying.“ In: *The Journal of experimental medicine* 33.1, S. 69–75. ISSN: 0022-1007.

- Syafrizayanti, C. Betzen, J. D. Hoheisel und D. Kastelic (2014). „Methods for analyzing and quantifying protein-protein interaction“. In: *Expert review of proteomics* 11.1, S. 107–120. ISSN: 1744-8387.
- Szeffler, S. J., J. F. Chmiel, A. M. Fitzpatrick, G. Giacoia, T. P. Green, D. J. Jackson, H. C. Nielsen, W. Phipatanakul und H. H. Raissy (2014). „Asthma across the ages: Knowledge gaps in childhood asthma“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133.1, S. 3–13. ISSN: 00916749.
- Szklarczyk, D. u. a. (2015). „STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life“. In: *Nucleic acids research* 43.Database issue, S. D447–52. ISSN: 0305-1048.
- Tan, S., I. P. Hall, J. Dewar, E. Dow und B. Lipworth (1997). „Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics“. In: *The Lancet* 350.9083, S. 995–999. ISSN: 01406736.
- Tan, W. C. (2005). „Viruses in asthma exacerbations“. In: *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11.1, S. 21–26. ISSN: 1070-5287.
- Tarasidis, G. S. und K. F. Wilson (2015). „Diagnosis of asthma: clinical assessment“. In: *International forum of allergy & rhinology* 5 Suppl 1, S23–6. ISSN: 2042-6976.
- Tarassov, K. u. a. (2008). „An in vivo map of the yeast protein interactome“. In: *Science* 320.5882, S. 1465–1470. ISSN: 0036-8075.
- Tavendale, R., D. F. Macgregor, S. Mukhopadhyay und C. N. A. Palmer (2008). „A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121.4, S. 860–863. ISSN: 00916749.
- Taylor, D. R. (2007). „b-Adrenergic receptor polymorphisms: relationship to the b-agonist controversy and clinical implications“. In: *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 8.18, S. 3195–3203. ISSN: 1465-6566.
- Taylor, D. R., J. M. Drazen, G. P. Herbison, C. N. Yandava, R. J. Hancox und G. I. Town (2000). „Asthma exacerbations during long term beta agonist use: influence of beta(2) adrenoceptor polymorphism“. In: *Thorax* 55.9, S. 762–767. ISSN: 0040-6376.
- Tenero, L., G. Tezza, E. Cattazzo und G. Piacentini (2013). „Wheezing in preschool children“. In: *Early human development* 89 Suppl 3, S13–7. ISSN: 0378-3782.
- Thanawala, V. J. u. a. (2013). „beta2-Adrenoceptor agonists are required for development of the asthma phenotype in a murine model“. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 48.2, S. 220–229. ISSN: 1044-1549.
- Toncheva, A. A. u. a. (2015). „Childhood asthma is associated with mutations and gene expression differences of ORMDL genes that can interact“. In: *Allergy* 70.10, S. 1288–1299. ISSN: 01054538.
- Torío, A. u. a. (2003). „HLA class II genotypic frequencies in atopic asthma: association of DRB1\*01-DQB1\*0501 genotype with *Artemisia vulgaris* allergic asthma“. In: *Human immunology* 64.8, S. 811–815. ISSN: 1879-1166.

- Trompeter, H.-I., S. Weinhold, C. Thiel, P. Wernet und M. Uhrberg (2003). „Rapid and highly efficient gene transfer into natural killer cells by nucleofection“. In: *Journal of immunological methods* 274.1-2, S. 245–256. ISSN: 0022-1759.
- Turki, J., J. Pak, S. A. Green, R. J. Martin und S. B. Liggett (1995). „Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype“. In: *The Journal of clinical investigation* 95.4, S. 1635–1641. ISSN: 0021-9738.
- Turner, S. W. u. a. (2004). „The relationship between infant airway function, childhood airway responsiveness, and asthma“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 169.8, S. 921–927. ISSN: 1535-4970.
- Turner, S. u. a. (2016). „Childhood asthma exacerbations and the Arg16 beta2-receptor polymorphism: A meta-analysis stratified by treatment“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 138.1, 107–113.e5. ISSN: 1097-6825.
- Turyk, M. E., E. Hernandez, R. J. Wright, S. Freels, J. Slezak, A. Contraras, J. Piorkowski und V. W. Persky (2008). „Stressful life events and asthma in adolescents“. In: *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 19.3, S. 255–263. ISSN: 1399-3038.
- Tyson, J. R. und C. J. Stirling (2000). „LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum“. In: *The EMBO journal* 19.23, S. 6440–6452. ISSN: 0261-4189.
- Uetz, P. und R. E. Hughes (2000a). „Systematic and large-scale two-hybrid screens“. In: *Current opinion in microbiology* 3.3, S. 303–308. ISSN: 1369-5274.
- Uetz, P. u. a. (2000b). „A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*“. In: *Nature* 403.6770, S. 623–627. ISSN: 0028-0836.
- Uetz, P. u. a. (2006). „Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome“. In: *Science* 311.5758, S. 239–242. ISSN: 0036-8075.
- van der Pouw Kraan, T. C. u. a. (1999). „An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma“. In: *Genes and immunity* 1.1, S. 61–65. ISSN: 1466-4879.
- van der Wiel, E., D. S. Postma, T. van der Molen, L. Schiphof-Godart, N. H. T. Ten Hacken und M. van den Berge (2014). „Effects of small airway dysfunction on the clinical expression of asthma: a focus on asthma symptoms and bronchial hyper-responsiveness“. In: *Allergy* 69.12, S. 1681–1688. ISSN: 01054538.
- van Echten-Deckert, G. und J. Walter (2012). „Sphingolipids: critical players in Alzheimer's disease“. In: *Progress in lipid research* 51.4, S. 378–393. ISSN: 1873-2194.
- van Eerdewegh, P. u. a. (2002). „Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness“. In: *Nature* 418.6896, S. 426–430. ISSN: 0028-0836.
- van Weemen, B. K. und A. H. Schuurs (1971). „Immunoassay using antigen-enzyme conjugates“. In: *FEBS Letters* 15.3, S. 232–236. ISSN: 00145793.
- Vavouri, T., J. I. Semple, R. Garcia Verdugo und B. Lehner (2009). „Intrinsic protein disorder and interaction promiscuity are widely associated with dosage sensitivity“. In: *Cell* 138.1, S. 198–208. ISSN: 00928674.

- Venkatesan, K. u. a. (2009). „An empirical framework for binary interactome mapping“. In: *Nature methods* 6.1, S. 83–90. ISSN: 1548-7105.
- Venter, J. C. u. a. (2001). „The Sequence of the Human Genome“. In: *Science* 291.5507, S. 1304–1351. ISSN: 0036-8075.
- Vidal, M. (2016). „How much of the human protein interactome remains to be mapped“. In: *Science signaling* 9.427, eg7. ISSN: 1937-9145.
- Vidal, M., M. E. Cusick und A.-L. Barabasi (2011). „Interactome networks and human disease“. In: *Cell* 144.6, S. 986–998. ISSN: 00928674.
- Vijverberg, S. J., M. W. Pijnenburg, A. M. Hovels, G. H. Koppelman und A.-H. Maitland-van der Zee (2017). „The need for precision medicine clinical trials in childhood asthma: rationale and design of the PUFFIN trial“. In: *Pharmacogenomics* 18.4, S. 393–401. ISSN: 1462-2416.
- Villaveces, J. M. u. a. (2015). „Merging and scoring molecular interactions utilising existing community standards: tools, use-cases and a case study“. In: *Database : the journal of biological databases and curation* 2015. ISSN: 1758-0463.
- Visscher, P. M., M. A. Brown, M. I. McCarthy und J. Yang (2012). „Five years of GWAS discovery“. In: *American journal of human genetics* 90.1, S. 7–24. ISSN: 0002-9297.
- Wahn, U., S. Lau, R. Bergmann, M. Kulig, J. Forster, K. Bergmann, C. P. Bauer und I. Guggenmoos-Holzmänn (1997). „Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 99.6 Pt 1, S. 763–769. ISSN: 1097-6825.
- Walker, C. (1993). „The immunology of extrinsic and intrinsic asthma“. In: *Agents and actions. Supplements* 43, S. 97–106. ISSN: 0379-0363.
- Walker, J. K. L., R. B. Penn, N. A. Hanania, B. F. Dickey und R. A. Bond (2011). „New perspectives regarding beta(2)-adrenoceptor ligands in the treatment of asthma“. In: *British Journal of Pharmacology* 163.1, S. 18–28. ISSN: 00071188.
- Walter, J. (2012). „g-Secretase, apolipoprotein E and cellular cholesterol metabolism“. In: *Current Alzheimer research* 9.2, S. 189–199. ISSN: 1875-5828.
- Walter, J. und G. van Echten-Deckert (2013). „Cross-talk of membrane lipids and Alzheimer-related proteins“. In: *Molecular neurodegeneration* 8, S. 34. ISSN: 1750-1326.
- Wang, J. u. a. (2008). „The diploid genome sequence of an Asian individual“. In: *Nature* 456.7218, S. 60–65. ISSN: 0028-0836.
- Wang, R.-S., H.-X. Jin, S.-Q. Shang, X.-Y. Liu, S.-J. Chen und Z.-B. Jin (2015). „Relación entre la expresión de IL-2 e IL-4 y sus polimorfismos y los riesgos de padecer infección por *Mycoplasma pneumoniae* y asma en niños“. In: *Archivos de bronconeumología*. ISSN: 1579-2129.
- Wang, Y.-H. und M. Wills-Karp (2011). „The potential role of interleukin-17 in severe asthma“. In: *Current allergy and asthma reports* 11.5, S. 388–394. ISSN: 1529-7322.
- Ward, W. W. und M. J. Cormier (1979). „An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein“. In: *The Journal of biological chemistry* 254.3, S. 781–788. ISSN: 1083-351X.
- Wechsler, M. E. u. a. (2009). „Effect of b2-adrenergic receptor polymorphism on response to longacting b2 agonist in asthma (LARGE trial): a genotype-stratified, randomi-



- sed, placebo-controlled, crossover trial". In: *The Lancet* 374.9703, S. 1754–1764. ISSN: 01406736.
- Wechsler, M. E. u. a. (2015). „Anticholinergic vs Long-Acting beta-Agonist in Combination With Inhaled Corticosteroids in Black Adults With Asthma: The BELT Randomized Clinical Trial". In: *JAMA* 314.16, S. 1720–1730. ISSN: 0098-7484.
- Wegmann, M. (2011). „Targeting eosinophil biology in asthma therapy". In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45.4, S. 667–674. ISSN: 1044-1549.
- Weiss, S. T. (1999). „Gene by environment interaction and asthma". In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 29 Suppl 2, S. 96–99. ISSN: 1365-2222.
- Weiss, S. T., A. A. Litonjua, C. Lange, R. Lazarus, S. B. Liggett, E. R. Bleeker und K. G. Tantisira (2006). „Overview of the pharmacogenetics of asthma treatment". In: *The pharmacogenomics journal* 6.5, S. 311–326. ISSN: 1473-1150.
- Weller, S., I. Cajigas, J. Morrell, C. Obie, G. Steel, S. J. Gould und D. Valle (2005). „Alternative splicing suggests extended function of PEX26 in peroxisome biogenesis". In: *American journal of human genetics* 76.6, S. 987–1007. ISSN: 0002-9297.
- Wenzel, S. E. (2012). „Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches". In: *Nature medicine* 18.5, S. 716–725. ISSN: 1078-8956.
- Wiese, S. u. a. (2007). „Proteomics Characterization of Mouse Kidney Peroxisomes by Tandem Mass Spectrometry and Protein Correlation Profiling". In: *Molecular & Cellular Proteomics* 6.12, S. 2045–2057. ISSN: 1535-9484.
- Williams, T. J. (2015). „Eotaxin-1 (CCL11)". In: *Frontiers in immunology* 6, S. 84. ISSN: 1664-3224.
- Willis, R. C. und C. W. V. Hogue (2006). „Searching, viewing, and visualizing data in the Biomolecular Interaction Network Database (BIND)". In: *Current protocols in bioinformatics* Chapter 8, Unit 8.9.
- Wills-Karp, M. (1998). „Interleukin-12 as a target for modulation of the inflammatory response in asthma". In: *Allergy* 53.2, S. 113–119. ISSN: 01054538.
- Wjst, M., M. Sargurupremraj und M. Arnold (2013). „Genome-wide association studies in asthma". In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 13.1, S. 112–118. ISSN: 1528-4050.
- Wlasiuk, G. und D. Vercelli (2012). „The farm effect, or: when, what and how a farming environment protects from asthma and allergic disease". In: *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 12.5, S. 461–466. ISSN: 1528-4050.
- Worgall, T. S., A. Veerappan, B. Sung, B. I. Kim, E. Weiner, R. Bholah, R. B. Silver, X.-C. Jiang und S. Worgall (2013). „Impaired sphingolipid synthesis in the respiratory tract induces airway hyperreactivity". In: *Science translational medicine* 5.186, 186ra67. ISSN: 1946-6242.
- Worthey, E. A. u. a. (2011). „Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease". In: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 13.3, S. 255–262. ISSN: 1530-0366.

- Wright, R. J., S. Cohen, V. Carey, S. T. Weiss und D. R. Gold (2002). „Parental stress as a predictor of wheezing in infancy: a prospective birth-cohort study“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 165.3, S. 358–365. ISSN: 1535-4970.
- Wu, C., J. Zhu und X. Zhang (2012). „Integrating gene expression and protein-protein interaction network to prioritize cancer-associated genes“. In: *BMC Bioinformatics* 13, S. 182. ISSN: 14712105.
- Wu, D., J. Zhou, H. Bi, L. Li, W. Gao, M. Huang, I. M. Adcock, P. J. Barnes und X. Yao (2014). „CCL11 as a potential diagnostic marker for asthma“. In: *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 51.8, S. 847–854. ISSN: 1532-4303.
- Wu, G. (2003). „Distinct Pathways for the Trafficking of Angiotensin II and Adrenergic Receptors from the Endoplasmic Reticulum to the Cell Surface: Rab1-independent Transport of a G Protein-coupled Receptor“. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.47, S. 47062–47069. ISSN: 0021-9258.
- Wu, H., I. Romieu, J.-J. Sienra-Monge, H. Li, B. E. del Rio-Navarro und S. J. London (2009). „Genetic variation in ORM1-like 3 (ORMDL3) and gasdermin-like (GSDML) and childhood asthma“. In: *Allergy* 64.4, S. 629–635. ISSN: 01054538.
- Wu, H., I. Romieu, J.-J. Sienra-Monge, B. E. del Rio-Navarro, D. M. Anderson, E. W. Dunn, L. L. Steiner, I. C. Lara-Sanchez und S. J. London (2007). „Parental smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor-alpha (TNF) and childhood asthma“. In: *Environmental health perspectives* 115.4, S. 616–622. ISSN: 0091-6765.
- Xu, X., M. Soutto, Q. Xie, S. Servick, C. Subramanian, A. G. von Arnim und C. H. Johnson (2007). „Imaging protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in plant and mammalian cells and tissues“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.24, S. 10264–10269. ISSN: 0027-8424.
- Xu, Y., D. W. Piston und C. H. Johnson (1999). „A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.1, S. 151–156. ISSN: 1091-6490.
- Yachdav, G. u. a. (2014). „PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features“. In: *Nucleic acids research* 42.Web Server issue, W337–43. ISSN: 0305-1048.
- Yamaguchi, A., O. Hori, D. M. Stern, E. Hartmann, S. Ogawa und M. Tohyama (1999). „Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation“. In: *The Journal of Cell Biology* 147.6, S. 1195–1204. ISSN: 0021-9525.
- Yang, W.-X. u. a. (2015). „E3 ubiquitin ligase Cbl-b suppresses human ORMDL3 expression through STAT6 mediation“. In: *FEBS Letters* 589.15, S. 1975–1980. ISSN: 00145793.
- Yatagai, Y. u. a. (2014). „Genomewide association study identifies HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 44.11, S. 1327–1334. ISSN: 1365-2222.

- Youle, R. J. und A. M. van der Bliek (2012). „Mitochondrial fission, fusion, and stress“. In: *Science (New York, N.Y.)* 337.6098, S. 1062–1065. ISSN: 0036-8075.
- Zar, H. J. und T. W. Ferkol (2014). „The global burden of respiratory disease-Impact on child health“. In: *Pediatric Pulmonology* 49.5, S. 430–434. ISSN: 87556863.
- Zdrengeha, M. T., H. Makrinioti, A. Muresan, S. L. Johnston und L. A. Stanciu (2015). „The role of macrophage IL-10/innate IFN interplay during virus-induced asthma“. In: *Reviews in medical virology* 25.1, S. 33–49. ISSN: 1099-1654.
- Zedan, M., G. Attia, M. M. Zedan, A. Osman, N. Abo-Elkheir, N. Maysara, T. Barakat und N. Gamil (2013). „Clinical asthma phenotypes and therapeutic responses“. In: *ISRN pediatrics* 2013, S. 824781. ISSN: 2090-469X.
- Zhang, H. P., C. E. Jia, Y. Lv, P. G. Gibson und G. Wang (2014). „Montelukast for prevention and treatment of asthma exacerbations in adults: Systematic review and meta-analysis“. In: *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 35.4, S. 278–287. ISSN: 1539-6304.
- Zhang, J., P. D. Paré und A. J. Sandford (2008). „Recent advances in asthma genetics“. In: *Respiratory Research* 9.1, S. 4. ISSN: 1465-9921.
- Zhao, Y.-F., Y.-M. Luo, W. Xiong und X.-L. Wu (2014). „Genetic variation in ORMDL3 gene may contribute to the risk of asthma: A meta-analysis“. In: *Human immunology*. ISSN: 0198-8859.
- Zheng, X.-y. u. a. (2014). „Interleukin-10 promoter 1082/-819/-592 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in Asians and atopic asthma: a meta-analysis“. In: *Lung* 192.1, S. 65–73. ISSN: 1432-1750.
- Zhou, B. u. a. (2005). „Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice“. In: *Nature immunology* 6.10, S. 1047–1053. ISSN: 1529-2908.
- Zhuang, L.-L., R. Jin, L.-H. Zhu, H.-G. Xu, Y. Li, S. Gao, J.-Y. Liu, G.-P. Zhou und C. Schönbach (2013). „Promoter Characterization and Role of cAMP/PKA/CREB in the Basal Transcription of the Mouse ORMDL3 Gene“. In: *PLoS ONE* 8.4, e60630. ISSN: 1932-6203.
- Zuurhout, M. J. L., S. J. H. Vijverberg, J. A. M. Raaijmakers, L. Koenderman, D. S. Postma, G. H. Koppelman und A. H. Maitland-van der Zee (2013). „Arg16 ADRB2 genotype increases the risk of asthma exacerbation in children with a reported use of long-acting b2-agonists: results of the PACMAN cohort“. In: *Pharmacogenomics* 14.16, S. 1965–1971. ISSN: 1462-2416.